U N I V E R S I T A R I A
E R I A B I O L O G I A

Dorina Cachiță-Cosma Aurel Ardelean

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE VEGETALĂ

VOL. 2

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II-11.974

EDITURA DACIA

acu III – 11974

37,5 lei

TRATAT

DE

BIOTEHNOLOGIE

VEGETALĂ

VOL. II

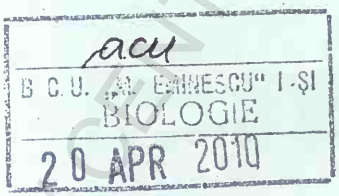
659737
B.C.U. IASI

EDITURA DACIA
Cluj-Napoca

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- ***Prof.univ.dr. Dorina CACHIȚĂ-COSMA***
  -Universitatea de Vest „Vasile Goldiş" Arad
  Facultatea de Ştiinţe ale Naturii
  -Preşedinte al Asociaţiei Române de Culturi de Ţesuturi şi Celule Vegetale

- ***Prof.univ.dr. Aurel ARDELEAN***
  -Universitatea de Vest „Vasile Goldiş" Arad
  Facultatea de Ştiinţe ale Naturii



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Dorina Cachiță-Cosma Aurel Ardelean

TRATAT DE BIOTEHNOLOGIE VEGETALĂ

Vol. II

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Colecția **UNIVERSITARIA**

Coperta: **Victor Cachiță**

Referenți științifici:

Prof.univ.dr. CONSTANTIN CRĂCIUN, Director al Centrului de Microscopie Electronică; Universitatea „Babeș-Bolyai" Cluj-Napoca; Fac. de Biologie-Geologie

Prof.univ.dr. ADELINA POP, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara; Facultatea de Horticultură.

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

CACHIȚĂ-COSMA, DORINA

Tratat de biotehnologie vegetală vol. II / Dorina Cachiță-Cosma, Aurel Ardelean. - Cluj-Napoca : Dacia, 2009

Bibliogr.

ISBN 978-973-35-2466-3

I. Ardelean, Aurel

57:62:633/635

Editura Dacia

B-dul 21 Decembrie 1989, nr. 62, ap. 6

Cluj-Napoca, cod poștal: 400124

tel /fax (0264) 452.178

email: marketingdacia@yahoo.com

www.edituradacia.ro

© Toate drepturile asupra acestei ediții aparțin autorilor.

All rights teserved. Printed in România. No parts of this publication may be reproduced or distributed in any form or by any means, or stored in a data base or retrieval system, without the prior permission of the author.

Toate drepturile rezervate. Tipărit în România. Nici o parte din această lucrare nu poate fi reprodusă sub nici o formă, prin nici un mijloc mecanic sau electronic, sau stocată într-o bază de date fără acordul în prealabil, în scris, al autorului.

Tehnoredactare computerizată: ing. Victor Cachiță

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

PREFAȚĂ 8
1. STUDIEREA ÎN REGIM DE VITROCULTURĂ A BOLILOR PLANTELOR ȘI A FENOMENELOR DE SIMBIOZĂ 11
1.1. INTERACȚIONAREA PLANTELOR CU MICROORGANISMELE 11
1.2. MICROORGANISMELE FITOPATOGENE ȘI CELE FITOSIMBIONTE ... 31
1.2.1. VIRUSURILE ȘI PARTICULELE VIRALE. CARACTERISTICI BIOLOGICE 31
1.2.1.1. Virusurile 31
1.2.1.1.1. Descoperirea virusurilor 31
1.2.1.1.2. Alcătuirea virusurilor 32
1.2.1.1.3. Proprietățile virusurilor 34
1.2.1.1.4. Metode de identificare a naturii virusurilor cauzatoare de boli la plante 39
1.2.1.1.4.1. *Biotestele* 40
1.2.1.1.4.2. *Testele serologice* 44
1.2.1.1.4.3. *Alte tehnici de punere în evidență a fitovirozelor* 47
1.2.1.1.5. Combaterea fitovirozelor 48
1.2.1.1.5.1. *Termoterapia* 48
1.2.1.1.5.2. *Chimioterapia* 51
1.2.1.1.5.3. *Bioterapia* 53
1.2.1.1.5.4. *Obținerea „in vitro" de plante „libere de viroze", prin culturi de meristeme sau prin tehnici de microgrefare* 54
1.2.1.2. Viroizii 56
1.2.1.3. Bacteriofagii 57
1.2.2. MICROORGANISMELE PROPRIU-ZISE, FITOPATOGENE ȘI FITOSIMBIONTE 57
1.2.2.1. Bacteriile 58
1.2.2.1.1. Considerații generale 58
1.2.2.1.2. Bacteriile fitopatogene, neoplazice 61
1.2.2.1.3. Bacteriile azotofixatoare sau simbioza diazotrofă 70
1.2.2.2. Micoplasmele 76
1.2.2.3. Rickettsiile 77
1.2.2.4. Fungii microscopici 77
1.2.2.4.1. Fitopatogenitatea de natură fungică 79
1.2.2.4.2. Fungii simbionți. Micorizarea 79
1.3. STAREA CANCEROASĂ ÎN CELULELE ȘI ȚESUTURILE VEGETALE .. 84
1.4. VITROCULTURILE VEGETALE ÎN SPRIJINUL CERCETĂRII FENOMENELOR DE FITOPATOGENITATE ȘI DE FITOSIMBIOZĂ 87
1.4.1. COCULTURA SAU CULTURILE ASOCIATE DINTRE FITOINOCULI ȘI MICROORGANISME 87
1.4.1.1. Considerații generale 87

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.4.1.2. Scurt istoric cu privire la cercetările efectuate în decursul secolului XX în direcția studierii reacțiilor inoculilor vegetali infectați, natural sau artificial, cu agenți fitopatogeni sau fitosimbionți 91
1.4.1.3. Studierea *patologiei* celulei vegetale, în regim de vitrocultură 100
1.4.1.3.1. Particularități morfofiziologice și biochimice manifeste la nivelul fitoinoculilor infestați artificial cu *virusuri* sau cu *viroizi* 100
1.4.1.3.2. Vitroculturi vegetale asociate cu *bacteriile* fitopatogene sau cu cele fitosaprofite 106
1.4.1.3.3. Cocultivarea fitoinoculilor cu *fungi* fitopatogeni sau fitosaprofiți 124
1.4.1.3.4. Implicarea vitroculturilor vegetale în studierea stării canceroase în celulele plantelor 125
1.4.1.4. Studierea fenomenelor de *simbioză*, prin intermediul vitroculturilor vegetale 139
1.4.1.4.1. Coculturi *simbionte* realizate între fitoinoculi și bacterii (*bacterizarea*), respectiv *bacteriorizarea* 142
1.4.1.4.2. Coculturi *simbionte* realizate între fitoinoculi și fungi (*micorizarea*) 148
1.5. COCULTURI DE DURATĂ, PRODUSE SPONTAN, ÎNTRE FITOINOCULI ȘI UN FUNG SAPROFIT 165
1.6. GREFELE SAU FITOINOCULI ASOCIAȚI 170
1.6.1. CONSIDERAȚII GENERALE 170
1.6.2. PRINCIPIILE DE BAZĂ CARE TREBUIE RESPECTATE ÎN PRACTICILE DE ALTOIRE (GREFARE) 178
1.6.3. TIPURILE DE GREFE PRACTICATE „*IN VITRO*" 188
1.6.3.1. Vitrografele – obiective investigate 191
2. HIPERHIDRIA SAU VITRIFICAREA FITOINOCULILOR 200
2.1. INTRODUCERE 200
2.2. PRINCIPALELE ASPECTE CARE CARACTERIZEAZĂ STAREA DE *HIPERHIDRIE* LA FITOINOCULI. POTENȚIALII FACTORI RESPONSABILI DE PRODUCEREA ACESTUI FENOMEN 203
2.2.1. PARTICULARITĂȚI MORFOANATOMICE, CITOLOGICE, ULTRASTRUCTURALE, FIZIOLOGICE ȘI BIOCHIMICE ÎNTÂLNITE LA FITOINOCULII *HIPERHIDRICI* 203
2.2.2. POTENȚIALELE CAUZE RESPONSABILE DE PRODUCEREA *HIPERHIDRIEI* LA NIVELUL FITOINOCULILOR 237
2.2.2.1. Cauzele ecofiziologice care induc și susțin producerea *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor
2.2.2.1.1. Starea fizică a mediului de cultură și interrelaționarea acestui factor cu natura chimică a compușilor prezenți în substrat 237
2.2.2.1.2. Compoziția atmosferei din recipientele de cultură și incidența *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor 245
2.2.2.1.3. Incidența *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor în funcție de natura regulatorilor de creștere prezenți în mediul de cultură și concentrația acestora 250

BCU IAȘI

2.2.2.1.4. Importanța naturii glucidului introdus în mediul de cultură, ca substrat respirator, în prevenirea *hiperhidriei* la fitoinoculi 256
2.2.2.1.5. Alți factori externi care pot determina instalarea *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor 259
2.2.2.2. Factorul genetic 262
2.3. POSIBILITĂȚI DE PREVENIRE SAU DE REMEDIERE A STĂRII DE *HIPERHIDRIE*, LA FITOINOCULI 266
2.3.1. METODE DE PREVENIRE A *HIPERHIDRIEI* SAU DE ANIHILARE A ACESTEIA, DUPĂ INSTALAREA EI ÎN ȚESUTURI 269
2.3.1.1. Modificarea condițiilor de cultură, în scopul prevenirii apariției *hiperhidriei* 269
2.4. DEVITRIFICAREA 276
BIBLIOGRAFIE 279

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREFAȚĂ

Biotehnologia vegetală își are originea în tehnicile de cultivare *in vitro* a țesuturilor și celulelor vegetale. Cercetările în acest domeniu au demarat în urmă cu mai bine de o sută de ani, și au progresat vertiginos mai ales după ce a luat sfârșit cel de al doilea război mondial. Această dezvoltare s-a accelerat pe măsură ce s-au perfecționat tehnicile de laborator, și s-au îmbogățit cunoștințele științifice în domeniile fiziologiei, geneticii, chimiei și în cel al biochimiei vegetale.

Descoperirea fitohormonilor și a rolului acestora, precum și a variaților regulatori de creștere, ce sunt utilizați cu succes în vitroculturile vegetale, dar și în practicile agricole și în cele silvice, a permis operatorilor dirijarea – la nivelul fitoinoculilor – a proceselor de morfo- și organogeneză, respectiv de embriogeneză somatică, și ridicarea randamentului în micropropagarea plantelor de interes economic. Totodată, prin tehnicile de vitrocultură s-a realizat obținerea de plante sănătoase, în special libere de viroze. Actualmente, numeroase specii vegetale beneficiază de o rapidă clonare industrială a lor, în sisteme automatizate și chiar robotizate.

Cercetările mondiale – în această ramură a biologiei vegetale – se îndreaptă, preponderent, spre descoperirea a cât mai multe și mai eficiente căi de îmbunătățire a reacției fitoinoculilor la variate condiții de viață, dar și spre modificarea genomului plantelor, în direcția creării de noi genotipuri, cât mai performante, utile societății umane moderne, cu cerințe într-o continuă creștere etc.

Dată fiind importanța biotehnologiei vegetale, în cadrul biotehnologiei generale, actuale, am considerat oportună editarea celui de al II-lea volum al *Tratatului de Biotehnologie Vegetală*, axat pe efectuarea de sinteze privind aspectele teoretice și practice legate de raporturile și interrelațiile care iau naștere între partenerii aflați într-un regim de cocultură, respectiv între fitoinoculi și diferite microorganisme (în principal, virusuri, bacterii sau fungi), în situația asocierii lor într-un același recipient de cultură, sau al executării de fitovitrografe.

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tehnicile de vitrocultură au adus mari servicii fitopatologiei, mai ales în elucidarea mecanismelor celulare şi moleculare care se află la baza cancerului vegetal.

În prezentul tratat sunt dezbătute şi aspecte legate de biotizare, respectiv relaţiile de *simbioză* care se stabilesc între ţesuturile şi organele vegetale, cu bacteriile sau fungii de acest tip. Prin intermediul bacteriorizelor şi cel al micorizelor, exvitroplantulele beneficiază de o optimizare a capacităţilor de supravieţuire şi de dezvoltare a lor, mai ales în momentul transferării acestora în mediul natural de viaţă.

Prezentul volum al *Tratatului de Biotehnologie Vegetală* se adresează tuturor biologilor, în special a acelora care au tangenţă cu biologia vegetală, precum şi studenţilor, respectiv masteranzilor şi doctoranzilor, punându-le la dispoziţie cele mai noi informaţii existente în momentul de faţă în domeniul coculturilor care implică fitoinoculii.

Autorii

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. STUDIEREA ÎN REGIM DE VITROCULTURĂ A BOLILOR PLANTELOR ŞI A FENOMENELOR DE SIMBIOZĂ

1.1. INTERACŢIONAREA PLANTELOR CU MICROORGANISMELE

Între plante şi mediul înconjurător se stabilesc relaţii complexe. Plantele, ca şi oricare fiinţă vie, trăiesc graţie permanentelor schimburi pe care acestea le realizează cu mediul înconjurător.

Pentru plante, ca şi pentru celelalte vieţuitoare, mediul ambiant reprezintă, în primul rând, sursa de hrană, de apă, de oxigen (în cazul organismelor aerobe), de întuneric sau de lumină, iar pentru lumea vegetală şi de CO_2. Dar, mediul ambiant este şi o permanentă sursă de pericole, printre care se înscriu şi *bolile* provocate plantelor de către diferiţii *agenţi fitopatogeni*, ştiinţa care se ocupă cu studierea *bolilor* plantelor fiind *fitopatologia* (în l. greacă: *phyton* = plantă; *pathos* = boală şi *logos* = ştiinţă, vorbire).

Plantele, mai ales cele terestre, stabilesc relaţii speciale cu *solul*, substrat complex în care marea majoritate a acestora se află fixate prin sistemul lor radicular. Raporturile funcţionale ale rădăcinilor plantelor cu solul privesc nu numai absorbţia apei şi a sărurilor minerale existente în structura acestuia, respectiv nutriţia, ci şi cele vizând respiraţia şi interacţia dintre ele şi alte vieţuitoare aflate în vecinătatea lor, şi altele.

Interrelaţiile care se realizează între celulele ţesuturilor sistemului radicular al plantelor şi factorii biotici din sol (*rizosfera*) joacă un rol major în viaţa acestora. Nu trebuie scăpat din vedere şi faptul că, un gram de sol conţine peste un milion de microorganisme (*Strange*, 2003).

În natură, factori *biotici* precum omul, animalele şi plantele, în general, dar şi cei *abiotici* (atmosfera, apa, rocile şi solul), sunt deţinători şi purtători de *microorganisme*, şi de spori ai acestora.

Microorganismele sunt vieţuitoare care au dimensiuni de sub un milimetru. Ele diferă foarte mult unele de altele nu numai ca mărime, sau din punct de vedere morfofiziologic, ci şi genetic. Ca încadrare taxonomică, caracteristica lor comună – care le reuneşte într-o grupare biologică artificial creată – este aceea a micimii corpului. În funcţie de aceasta, ele pot fi subîmpărţite în organisme *submicroscopice* şi *microscopice*. În categoria mare a

BUAV CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

microorganismelor se încadrează atât *virusurile*, *bacteriile*, *fungii*, *protozoarele*, cât și *algele* microscopice.

Dintre microorganisme, în capitolul de față se au în vedere doar acei reprezentanți care împreună cu cormofitele se află în raporturi naturale de *patobioză* sau de *simbioză*.

Natura relațiilor care se stabilesc între *plantele* și *microorganismele* care populează diferitele medii *biotice* sunt încă în mică măsură cunoscute.

În ecosistemele naturale sunt prezente variate microorganisme, care cu plantele se pot afla în raporturi deosebit de complexe. În funcție de *gen*, de *specie* și chiar de *genotip* (rasă, sușe, linie, tulpină), iar la cormofite și în dependență de organul implicat în astfel de relații, de stadiul ontogenetic, respectiv de fenofază în care se află organismul, factorii *biotici* – alături de cei *climaterici* – în cadrul ecosistemului, își lasă amprenta asupra manifestării raporturilor intervenite între microorganisme (una sau mai multe specii) și plante, acestea îmbrăcând diferite forme. Astfel, relațiile dintre *microorganisme* și speciile vegetale cu care acestea se află în contact (sau în imediata vecinătate) pot fi ***indiferente***, *fitosaprofite nonagresive* (*necrotrofice*), *interactive* – organisme care acționează în parteneriat cu ele, cum este cazul celor de tip ***simbiont***, a *micorizelor* sau a nodozităților, respectiv a *rizobiilor* – ori sunt de tip ***fitopatogen***, cum sunt *paraziți* obligatorii (*virusuri*, unele *bacterii* și unii *fungi* – în ansamblu microorganismele *biotrofe*), care provoacă boli la plante. În lumea vegetală se întâlnesc, însă, și microorganisme *semibiotrofe* (*semiparazite*), *parțial parazite* și parțial *necrofage*, cum este de exemplu cazul ciupercii *Phytophtora infestans*.

În natură, variatele *microorganisme* ocupă *nișe ecologice* diferite. Microorganismele sunt adaptate în a-și duce existența în diversitatea mediilor de pe Terra, ele prezentând particularități ecofiziologice variate, în ceea ce privește cerințele lor de viață. Aceste condiții trebuie să le permită dezvoltarea și reproducerea fie într-un regim optim de mediu, fie situat la limita lor de supraviețuire.

În lumea microorganismelor se întâlnesc și tipuri biologice speciale, care sunt apte să suporte transformări profunde, de lungă durată, ca o reacție de adaptare a acestora la o supraviețuire a lor în condiții extreme de viață, așa numitele forme de *rezistență*. Unele microorganisme *fitopatogene* – pentru o mai lungă sau mai scurtă perioadă de timp – și-au dezvoltat abilități de supraviețuire în afara plantelor gazde; alte tipuri, cum este cazul ruginii grâului (*Puccinia graminis*), în decursul ciclului ei biologic, obligatoriu necesită parcurgerea a două stadii succesive de parazitism, efectuate pe două specii diferite de plante gazde, faze care se condiționează reciproc.

În cazul paraziților *polifitofagi*, cerințele microorganismelor sunt mai puțin restrictive.

Bacteriile *fitopatogene* sau cele *fitosaprofite*, ori *fungii necrotrofici* (prezenți la nivelul diferitelor organe ale plantelor), sau cei *simbionți*, sunt microorganisme care se găsesc răspândite în biosferă, în variate medii de viață, populate și de plante.

Bolile plantelor se propagă, cu o mai mare sau mai mică rapiditate, prin *sporii* sau prin *germenii*. Aceștia sunt diseminați în ecosistem prin intermediul apei, a vântului, a animalelor, sau chiar a omului, în funcție și de distanțele care trebuie parcurse de aceștia, de condițiile meteorologice, de prezența în teren a vectorilor și natura lor etc. *Vectorii* microorganismelor se constituie – de cele mai multe ori – în potențiale pericole pentru plante, întrucât viețuitoarele, mobile fiind, sau curenții de aer, ori cei de apă, pot deplasa germeni la mari distanțe. Aceste aspecte trebuie avute în vedere atunci când se impune adoptarea unor măsuri de carantină fitosanitară.

Infestarea viețuitoarelor, respectiv a plantelor, cu agenți fitopatogeni poate să fie *externă*, prezentă numai la suprafața organelor, ori *internă*, care poate fi *interstițială* sau *intracelulară*.

În cazul în care s-a produs un atac fitopatogen, declanșat de către microorganisme, manifest prin variate forme de *patogenitate* („suferințele" exteriorizate într-o mai mare sau mai mică măsură, chiar și în situația instalării în plante a unui proces de *simbioză*), acesta se impune a fi analizat *macro-* și/sau *microscopic*, reacțiile intervenite la nivelul morfologiei organelor, sau cele remarcate în structurile acestora, necesitând efectuarea de investigații mai complexe, de ordin *fiziologic*, *biochimic*, sau chiar de *biologie moleculară*.

Studiile care privesc aspectele de *fitopatogenitate* cuprind o gamă largă de probleme, întrucât atacurile microorganismelor de acest tip exercită nu numai distrugeri ale organelor plantelor (sau ale întregului corp al acestora), ci ele aduc și pierderi însemnate producțiilor agricole, care la nivel mondial se estimează a fi, în medie, de aproximativ 33% (*Pârvu*, 1996). Bolile plantelor provoacă, totodată, și o scădere a calității produselor vegetale.

Fenomene complexe se nasc și în cadrul raporturilor cu totul speciale care se stabilesc în *rizosferă*, în cazul *simbiozelor*, între sistemul radicular al cormofitelor și bacteriile sau fungii din sol, respectiv parteneriatul realizat între hifele simbionte și rădăcinile plantelor, se soldează cu formarea de asociații de tip *micorizal* (*micorize*) sau *bacterian* (*bacteriorize*).

Simbioza presupune o asociere a două sau a mai multor viețuitoare, aparținând unor genuri sau specii diferite, organisme care intercorelate prin relații morfofiziologice și biochimice se susțin reciproc, desfășurând o acti-

BCU CLUJ CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

vitate biologică benefică pentru întregul sistem de parteneriat realizat în comun (*Zamfirache* și *Toma*, 2000). Uneori, relațiile interactive stabilite în cadrul unui astfel de parteneriat se pot situa la limita bolii.

Reacțiile celulelor și a țesuturilor vegetale, la atacul produs asupra lor de către unele microorganisme (agenți *fitopatogeni* sau *simbionți*), depind și de capacitatea plantelor de a preveni ori de a limita, la locul atacului, *răspândirea* infecției în organ, respectiv propagarea acesteia în întregul organism vegetal.

În studiile de *fitoetiologie*, cercetările au fost orientate în direcția elucidării proceselor legate de *mecanismele* implicate în *reacțiile de contact* și de *recunoaștere* a gazdelor de către microorganismele infestante, precum și în depistarea *interrealțiilor* și a *raporturilor* care se stabilesc între parteneri (*semnalizări* și *comunicări* intercelulare), cauze ce concură la *producerea* bolii, *consecințele* invadării celulelor și a țesuturilor atacate de către agenții fitopatogeni, apariția *reacțiilor* de respingere sau, dimpotrivă, instalarea unor relații de *parteneriat* – în cazul *simbiozelor* – *factorii* care favorizează, respectiv accelerează producerea unor astfel de manifestări, ori care *blochează* avansarea colonizării, *lupta* celulelor pentru supraviețuire, și în ce constă aceasta, reprezintă aspecte care se cer analizate și explicate.

Descoperirea factorilor implicați în stabilirea unor astfel de raporturi, și înțelegerea naturii lor, s-a făcut prin efectuarea de studii de *microscopie* (optică sau electronică), de *bio-* și *citochimie* (mai ales de *enzimologie*), iar în momentul apariției *fitovitrotehnicilor* examinările au fost extinse și în direcția executării de observații referitoare la comportamentul partenerilor într-un regim artificial de *cocultură*, respectiv de *culturi asociate*.

Intuirea căilor de interacție între microorganismul atacant sau simbiont, și celula, țesutul sau/și organul vegetal gazdă, a suscitat interesul multor cercetători, mai ales în ceea ce privește analizarea aspectelor referitoare la *particularitățile metabolice* care intervin într-o astfel de relație, ce au un grad înalt de specificitate, respectiv *toxinele* (*fitopatotoxinele*) produse de către agentul patogen și *lupta* desfășurată – pe plan celular și molecular – între parazit și organismul invadat, *sintetizarea* în celulele agresate a unor molecule de apărare (*fitoalexine*), *stoparea diviziunilor* celulare și *diminuarea creșterii* sau, dimpotrivă – în cazul *tumorogenezei* – declanșarea unei *stimulări* a *înmulțirii haotice* a celulelor *neoplazice*, ori manifestarea unei *rezistențe* a gazdei în raport cu agresorul fitopatogen, soldată cu sinteza de *inhibitori* proteazici specifici, și altele. Astfel de reacții multiple se cer investigate profund.

În cazul *simbiozei* de tip *micorizal*, hifele fungului prezent exogen sau endogen, ori exo- endogen, la nivelul rădăcinilor, contribuie la o mai bu-

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

nă aprovizionare a organismul vegetal cu apă şi cu nutrienţi minerali, în timp ce planta – în contrapartidă – cedează miceliului *simbiont* glucide cu valoare energetică ridicată. Invadarea ţesuturilor şi a celulelor vegetale (viitoare gazde), exogen sau endogen, de către microorganismele *simbionte*, dar mai ales de către agenţii *patogeni*, declanşează – la nivel local – producerea unor *reacţii* de *apărare*, de blocare a mecanismelor de penetrare şi de instalare a paraziţilor în ţesuturi, respectiv în celule, planta luptându-se cu aceştia; în cazul atacurilor cu germeni *fitopatogeni*, insuccesul reacţiilor de apărare, odată cu instalarea bolii, mai devreme sau mai târziu se concretizează prin apariţia la nivelul plantelor de modificări morfologice, biochimice şi fiziologice, de amploare variată. În timp, „lupta" dintre planta gazdă şi agentul sau agenţii invadatori se soldează, local, cu manifestarea unor *dezechilibre metabolice severe* (preponderent enzimatice), care afectează în principal proteosinteza şi biogeneza de fitohormoni, şi provoacă intensificarea, sau declinul, multor procese fiziologice, cum sunt cele care vizează *respiraţia*, *absorbţia*, *fotosinteza*, *transpiraţia*, inhibarea sau stimularea *proliferării* celulare, fenomene care se traduc – în planul general al întregului organism vegetal – prin apariţia de *tulburări* de *creştere*, de *diferenţiere*, de *morfogeneză*, şi altele. În astfel de situaţii, natura reacţiilor declanşate la nivelul organismului vegetal, şi intensitatea acestora, variază în funcţie de *tipul* agentului patogen infestant, *amploarea* atacului, *caracteristicile* organului invadat, respectiv parazitat, *vârsta* lui, *locaţia* acestuia în plantă, *rolul* său fiziologic etc. În celulele gazde, unele atacuri (de exemplu, ale lui *Agrobacterium tumefaciens*) pot declanşa proliferări haotice ale acestora, transformându-le în celule *tumorale*, schimbări care privesc provocarea unor dezechilibre fitohormonale ce vizează producerea de modificări profunde, care determină şi o alterare a tabloului ultrastructural al unor organite ale acestora.

Fenomenele fitopatologice depind nu numai de natura agentului şi a speciei infestante, ci şi dacă planta, organele sau ţesuturile acesteia au fost atacate, în acelaşi timp, şi de către alte maladii, intensitatea şi extinderea lor, dacă este vorba despre o suferinţă singulară sau *polivirală*, *multibacteriană*, *polimicotică*, ori o combinaţie a acestora (şi în ce proporţii), precum şi dacă organismul a fost afectat şi de alte disfuncţii fiziologice, cum sunt malabsorbţia ionică, ori deshidratarea, carenţa sau intoxicarea plantelor gazde cu anumite elemente sau compuşi chimici etc.

Odată cu producerea unei invazii intracelulare, marea majoritate a agenţilor fitopatogeni cauzează distrucţii endocelulare şi tisulare, parazitului generând la nivelul acestora perturbări mai mult sau mai puţin profunde,

care – în primul rând – afectează plasmalema și unele organite celulare, precum și schimburile intercelulare intermediate de *plasmodesme*.

Studiile moderne de *fiziopatologie* vegetală sunt axate nu numai pe îmbogățirea cunoștințelor referitoare la cauzele care conduc la descreșterea *rezistenței* celulelor atacate, în raport cu un anumit agent patogen invaziv, ci și pe efectuarea de cercetări în vederea descifrării modalităților de *luptă* ale celulelor împotriva distrucțiilor și a disfuncțiilor provocate de acesta (sau aceștia), soldate cu elaborarea de *mijloace de anihilare* a acțiunilor nocive exercitate de una sau mai multe *fitopatotoxine*, cu înțelegerea proceselor de inducere și de susținere a mecanismelor de luptă ale gazdei împotriva colonizării ei de către un agent fitopatogen etc.; odată infecția produsă, se caută descoperirea modului de *blocare*, de către planta atacată, a *invaziei* agentului infestant, la un anumit nivel, pentru *limitarea răspândirii bolii* în întreaga plantă.

Unii agenți fitopatogeni, odată pătrunși în organismele vegetale, pe diferite căi, se propagă în corpul acestora prin intermediul *plasmodesmelor*, în timp ce alții circulă prin plante, prin lumenul vaselor conducătoare.

Unele fitoinfecții, produse de germeni facultativ sau obligat paraziți, pot fi *asimptomatice*, infestarea țesuturilor plantelor putând fi, o lungă perioadă de timp, lipsită de manifestări negative.

În realizarea vitroculturilor vegetale axenice, prezența exogenă sau endogenă a unor microorganisme la nivelul fitoinoculilor ridică, uneori, probleme dificile în ceea ce privește realizarea asepsiei *in vitro*, întrucât speciile *endofite* – bacteriile sau fungii care colonizează spațiile intercelulare ale acestora cu patogeni latenți, asimptomatici o perioadă de timp – la un moment dat pot să se manifeste morfologic sau fiziologic, provocând schimbări care să afecteze planta gazdă, respectiv funcționalitatea unor organe sau țesuturi ale acesteia (*Isaac*, 1992). În această categorie de microorganisme intră, de exemplu, *Methylobacterium mesophilicum*, bacterie care în natură se găsește în asociație cu peste 70 de specii vegetale, ea transmițându-se și prin semințe.

Experimentele de cultivare *in vitro* a unor explante vegetale au relevat faptul că, succesul inițierii unor astfel de vitroculturi va depinde nu numai de înlăturarea prin metode de asepsie a contaminării externe a viitorilor fitoinoculi, ci și de anihilare a efectelor nefaste provocate de exteriorizarea – într-o anumită fază de evoluție a culturilor primare sau a subculturilor – a endomicroorganismelor, care timp îndelungat s-au manifestat *asimptomatic* ele exprimându-se în momentul în care au fost însumate condițiile optime de erupere a lor, uneori numai după amplasarea vitroplantulelor ex *vitro*, respectiv după transferarea acestora în mediul lor natural de

viață (*Taji* și colab., 1992). La plante, de regulă, microorganismele *endofite* nu dau semne manifeste a bolii (*Isaac*, 1992). Nu sunt încă cunoscute relațiile care se stabilesc între țesuturile și celulele care sunt gazde specifice pentru astfel de microorganisme *endofite*, dar s-a constatat că, la un moment dat, la nivelul plantelor sau a organelor care le dețin, pot interveni schimbări morfofiziologice evidente.

Adeseori, în regim de vitrocultură *virusurile*, *viroizii*, *micoplasmele* și *rickettsiile*, la nivelul fitoinoculilor aparent nu produc efecte fitopatologice, maladiile provocate de ele manifestându-se abia după transferarea vitroplantulelor generate din explante în mediul lor natural de viață. Astfel de microorganisme nu cresc pe medii specifice fitoinoculilor, ci prezența *virusurilor*, a *viroizilor* și a *micoplasmelor* poate fi depistată doar cu ajutorul unor plante indicatoare, sau prin examinări electronomicroscopice; infestarea țesuturilor cu *virusuri* și cu unele *bacterii* fitopatogene, cum sunt *Erwinia carotovora, Pseudomonas* și *Clavibacter*, poate fi identificată serologic.

Pentru a preîntâmpina producerea unor asemenea infecții, este de dorit ca o parte dintre fitoinoculi să fie subcultivați pe medii care să faciliteze dezvoltarea și manifestarea unor astfel de categorii de microorganisme. La unele tipuri de *vitroculturi* vegetale, pentru a preveni apariția unor infecții produse mai ales de microorganismele *endofite* este oportună, sau uneori este chiar obligatorie utilizarea de *antibiotice* ca adaosuri la mediile de cultură. Alteori, pentru a realiza culturi *aseptice* este recomandată prelevarea de explante de la plantule obținute prin germinarea *axenică* a semnițelor, ceea ce ne scutește de prezența de infecții în viitoarele vitroculturi vegetale, mai ales dacă după asepsizarea materialului semincer sunt îndepărtate tegumentele seminale.

Printre *endoinfecțiile* greu de depistat se numără și cele produse de *fungii* din genurile *Fusarium*, *Verticillium* și *Erwinia*, paraziți prezenți cu precădere în sistemul vascular al plantelor. Acest tip de *endoinfecții*, în regim de vitrocultură, mai devreme sau mai târziu „răbufnesc". Virozele, însă, pot fi evidențiate prin *bioteste*, sau pe cale *serologică*, prin testul ELISA (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*), ori prin examinări efectuate la *microscopul electronic*, ceea ce presupune „uciderea" materialului vegetal în decursul preparării eșantioanelor tisulare, în vederea analizării acestora. În industriile axate pe producerea de material de plantat regenerat din culturi de meristeme, depistarea *vitro-* sau exvitroplantulelor virusate, prin efectuarea de teste serologice sau biologice (cum este cazul testului *Chenopodium*) este obligatorie, întrucât în comercializarea răsadurilor rezultate pe calea micropropagării este indispensabilă însoțirea acestora cu un atestat de cali-

tate, care să certifice pe lângă apartenența genetică, și faptul că plantele generate *in vitro* sunt „libere de viroze".

În mod normal, *simptomatologia* diferitelor maladii fitopatogene este extrem de variată. *Boala* poate să se manifeste prin *modificări de culoare* (pătarea frunzelor, a florilor, a tulpinilor sau a fructelor), sau prin apariția de *necroze*, de *arsuri*, ori de *cloroze*, sau producerea de *colorări atipice* (brunificarea, înroșirea, îngălbenirea, ori înegrirea zonelor afectate), sau de *atrofii*, ori de *nanism* sau, dimpotrivă, de *hipertrofii* – mai mult sau mai puțin extinse – ori de *ofilire* a unor organe sau a plantelor, în întregimea lor etc.; manifestările pot să fie simple sau combinate, mai mult sau mai puțin complexe, anumite transformări fiind prezente – exteriorizate sau nu în momentul efectuării observațiilor – în funcție de stadiul de evoluție al bolii. *Tumefierea* unor țesuturi sau organe vegetale nu trebuie să fie confundată cu hipertrofiile, ori cu modificările morfofiziologice generate de înțepăturile produse în mezofilul foliar de unele insecte, cum sunt cele provocate de unele viespi, frunzelor de stejar. Astfel de atacuri induc, la nivelul frunzelor sau a fructelor unor specii vegetale, formarea de gale, în interiorul cărora se dezvoltă larva insectei respective. În foarte multe situații însă, procesele *tumorale* pot fi datorate și altor cauze, de natură variată.

Colorarea atipică a unor zone sau a unor organe ale plantelor, ori necrozarea țesuturilor, pot fi fenomene provocate și de carențarea acestora în anumite elemente chimice; în alte situații, supradozarea unor compuși în substratul de cultură, sau aplicarea unor tratamente cu pesticide, ori prezența zonală a unor agenți poluanți, pot fi cauze accidentale care declanșează o intoxicare a vegetației, afectând o parte dintre organe, fără ca aceste manifestări să fie un rezultat al unor atacuri fitopatogene.

Unele maladii marchează negativ întregul organism vegetal, caz în care boala este de tip *sistemic*. În această categorie de boli se încadrează *virozele*, unele *bacterioze* (instalate pe traiectul vaselor lemnoase), *micoplasmele* (infecții prezente în lumenul vaselor liberiene) și *micozele* (boli provocate de fungi, de exemplu de specii din genurile *Fusarium* și *Verticillium*); alteori, maladia este localizată într-un anumit tip de organ, de exemplu în frunze, care bolnave fiind se usucă și cad, eliberând planta de o parte dintre patogenii respectivi. În alte cazuri, infecția afectează rădăcinile, organe care în urma atacului putrezesc și se dezintegrează în sol. În ambele situații, agentul infestat persistă în sol, menținându-se în acesta ca un permanent potențial pericol, ca sursă de infecție pentru alte plante.

Este evident faptul că, diferiții agenți fitopatogeni manifestă *afinitate* și *agresivitate țintită* nu numai în raport cu genul sau specia vegetală gazdă, ci și față de un anumit organ sau țesut, uneori cu consecințe mai grave și o

infestare mai puternică atunci când plantele atacate sunt *tinere*. Consecințele unui atac, diferit ca intensitate și amploare, vor fi evaluate etiologic în funcție de *stadiul* de dezvoltare ontogenică a organelor sau a organismelor infestate, dar și de *natura agentului fitopatogen* care provoacă boala. În dependență de aceste situații, *starea* organismului atacat poate fi mai mult sau mai puțin gravă, în dependență și de *intensitatea infecției* și de *virulența agentului fitopatogen*, de *tipul organului* îmbolnăvit, *rolul* și *starea fiziologică* a acestuia, factori care în ansamblul lor se găsesc sub incidența favorabilă sau nefavorabilă a condițiilor de mediu. Descrierea reacțiilor constatate la nivelul locului de producere al atacului depinde din ce punct de vedere este analizată situația, a *gazdei* sau a *parazitului*, agresivitatea unui agent fitopatogen rezultând și din gradul de afectare a funcționalității unor țesuturi de importanță majoră pentru organul atacat (mai ales la frunze), dar și de rolul jucat de organ în viața plantei gazdă, în dependență de *fenofază*. Atacul produs la nivelul frunzelor, profunzimea acestuia și extinderea lui la întreaga masă foliară a plantei, sunt tot atâtea situații care pot provoca dezechilibre funcționale de diferite grade, și care pot leza – mai mult sau mai puțin sever – organismul vegetal.

Alterarea funcțiilor fiziologice la nivelul frunzelor bolnave, privește o posibilă intensificare a respirației ori/și a evapotranspirației, mărirea transpirației fiind soldată cu o dezechilibrare hidrică a acestora, fenomen care cauzează o pierdere temporară sau definitivă a turgescenței tisulare, situație care poate să conducă la ofilirea organului afectat de atacul fitopatogen, sau chiar a unei părți din planta bolnavă; pe de altă parte, infecția poate dezactiva zone din parenchimul asimilator, conducând nu numai la o scădere a randamentului fotosintezei, ci și la o disturbare a aprovizionării celulelor plantei cu glucide, compromițând și depunerile de substanțe de rezervă în semințe, tuberculi, rizomi sau în bulbi.

Persistența și extinderea traumelor și a dezechilibrelor provocate de către agenții fitopatogeni, la nivelul întregului aparat foliar, face ca – mai devreme sau mai târziu – frunzele bolnave să intre în *senescență*, respectiv acestea să manifeste un declin funcțional sever și astfel să se ajungă chiar la o defoliere timpurie a tulpinilor.

Daunele provocate plantelor de către variații agenți fitopatogeni determină și producerea în corpul acestora a unor dezechilibre biochimice, de natură *enzimatică* sau *fitotoxică*.

Atunci când atacul agentului fitopatogen nu se produce la nivelul unor structuri morfologice, cum sunt stomatele, hidatodele ori lenticele, sau a unor răni provocate pe căi variate, pătrunderea acestuia în plantă este facilitată de enzimele *eliberate* de microorganismul infestant, de exemplu de

tipul *cutinesterazei* sau a *carboxicutinesterazei*, care liposolubilizează cutina ce acoperă stratul epidermal, ori a *pectinazelor*, care hidrolizează pectatul de calciu (compus ce cimentează între ele celulele unui țesut vegetal), creând – în acest mod – fisuri intercelulare microscopice; o altă enzimă implicată în liza peretelui celular pectocelulozic este *celulaza*. Uneori, în cadrul atacului provocat de agentul fitopatogen poate acționa un amestec (în proporții variate) a acestor enzime, reacții biochimice care facilitează, de exemplu, penetrarea peretelui celular al plantelor de către hifele fungilor fitopatogeni, ele pătrunzând în interstițiile țesuturilor, respectiv în profunzimea structurilor organelor vegetale.

Agenții fitopatogeni, la nivelul țesuturilor pe care le parazitează, pot acționa nu numai prin anularea stării de normalitate în zona în care ei trăiesc (în urma înmulțirii acestora în celule sau în spațiile intercelulare), ci și prin privarea organelor, respectiv a plantelor atacate, de o serie de nutrienți cu care patogenul își asigură existența sa. Enzimele elaborate de atacator, la locul de impact, cauzează nu numai deteriorări ale pereților celulari, ci prin intermediul *hidrolazelor* – de tipul *amilazei*, *maltazei*, *lipazei*, a *proteazei*, și altele – agentul dezmembrează compușii organici nutritivi, iar prin mijlocirea *nucleazelor* acesta descompune acizii nucleici ai celulelor prazitate, până la nivel de nucleotide. Pe aceste căi, parazitul își procură o serie de compuși de care el are strictă nevoie, provocând distrucții severe în echilibrul metabolic al celulelor gazde. Pe lângă enzimele menționate, agenții fitopatogeni pot să dețină și endoenzime de tipul *oxidazelor*, *catalazelor* și a *reductazelor*, care servesc paraziților pentru desfășurarea la cote optime a metabolismului propriilor lor celule. Uneori, în funcție de natura plantei atacate, parazitul poate să-și sintetizeze enzime cu caracter *adaptativ*, menite să-i asigure acestuia supraviețuirea, în dependență de situația pe care el o întâlnește la nivelul plantei în care acesta se instalează.

Unii agenți fitopatogeni au un grad ridicat de particularizare a produșilor chimici de atac, specializare caracteristică unui anumit grup sau tip de agent patogen, în dependență de natura țesuturilor pe care le posedă potențiala plantă gazdă. În această categorie de substanțe se încadrează *fitopatotoxinele*, sintetizate și eliberate în celulele plantelor, sau în spațiile intercelulare ale acestora, de către diferiții agenți fitopatogeni, compuși organici foarte variați ca natură chimică, care sunt încă în mică măsură cunoscuți.

Fitopatotoxinele pot fi polipeptide (mai mult sau mai puțin complexe), glicoproteine, chinone, steroli, și mulți alți compuși. Există *patotoxine specifice*, care sunt elaborate numai de către anumiți agenți fitopatogeni, cu o acțiune fitotoxică restrânsă, și *toxinele neselective* (sau nespecifice, cum este cazul acidului fusaric, produs de către specii de *Fusarium*), ce produc

simptome de patogenitate atât la plantele frecvent atacate de microorganisme, cât şi la speciile vegetale care în mod obişnuit nu sunt populate cu respectivii agenţi patogeni.

Efectele negative exercitate de fitopatotoxine se manifestă prin producerea de reacţii locale, celulare sau tisulare (depigmentări sau pigmentări, ori cloroze, necroze, ofilire etc.), procese care slăbesc treptat rezistenţa gazdei la atacul agentului fitopatogen, epuizând planta. Ţesuturile sau celulele cultivate *in vitro*, în prezenţa în substratul de cultură a unor astfel de *fitotoxine* – utilizate ca factori de presiune în selectarea de linii celulare sau de calusuri din ce în ce mai rezistente la acţiunea nocivă a acestora – folosite fiind în concentraţii crescătoare, pe parcursul a mai multor subculturi, practicate în trepte, joacă un rol însemnat în izolarea de fitoinoculi desensibilizaţi la efectele patotoxinei respective. Fitoinoculii supravieţuitori unor astfel de condiţii, şi care la un moment dat manifestă morfogeneză în prezenţa patotoxinei în cauză (proprietate pe care o transmit şi exemplarelor vegetale regenerate din inoculii respectivi), dau naştere la plante rezistente la atacul produs de un anumit agent fitopatogen, care chiar dacă eliberează în ţesuturile vegetale gazdă toxina caracteristică, plantele infestate nu mai sunt afectate de aceasta.

Mecanismele prin care celulele, ţesuturile, organele, respectiv plantele atacate se apără, nu sunt pe deplin elucidate, cu atât mai mult cu cât există particularităţi individuale de reacţie, cum sunt: evenimentele moleculare specifice privind *semnalarea atacului*, *recunoaşterea naturii acestuia*, *declanşarea apărării celulare*, *căile de transport molecular a mesajelor de alarmă*, precum şi *reacţiile de răspuns* ale celulelor şi ţesuturilor plantelor, în raport cu infecţia produsă, în funcţie de tipul agentului, amploarea atacului, şi altele. Aceste aspecte reprezintă tot atâtea modalităţi de reacţie, manifestări care ţin de specia atacată, dar şi de aceea a genotipului agentului fitopatogen, ori de tipul celulelor infestate, capacitatea lor de a sintetiza moleculele de apărare, care să determine producerea de modificări structurale sau (şi) biochimice, menite să stăvilească pe moment, ori în timp, invazia celulelor vegetale de către agentul fitopatogen în cauză, ş.a.m.d.

Compuşii ale căror molecule pot cauza, la nivel celular, reacţii structurale şi (ori) biochimice, au fost denumiţi *elicitori* (în l. latină *elegere* = a alege). *Elicitorul* este un *stimul* care poate fi de natură fizică, chimică sau biologică, ce declanşează din partea organismului vegetal o reacţie de apărare. Întrucât elicitorii preexistă în plante înaintea evidenţierii atacului fitopatogen, aceştia au mai fost denumiţi şi *fitoanticipine* (*Karamanoli*, 2002 şi *Strange*, 2003). Din punct de vedere chimic, ei pot fi glicoproteine, poliza-

haride, peptide, enzime pectolitice, și altele, și au fost evidențiate, de exemplu, la nivelul pereților celulari ai hifelor ciupercilor.

De regulă, *elicitorii* chimici au o greutate moleculară mare. Ei determină, în potențialele celule gazde, sintetizarea de *fitoalexine* sau, alteori, induc producerea unor reacții locale de hipersensibilitate, cu generarea de compuși *subresori* meniți să *reprime* – în celulele atacate – elaborarea de *fitoalexine*, ceea ce face ca agentul patogen să se răspândească cu ușurință în planta lipsită de apărare.

Fitoalexinele (denumire dată acestora de *Müller* și *Börger*, 1940, de la grecescul *phyton* = plantă și *alexin* = substanță protectoare, după *Strange*, 2003) sunt compuși de natură variată (peste 350 de tipuri de substanțe), cei mai frecvent întâlniți făcând parte din categoria *antocianilor*. *Fitoalexinele* exercită efecte toxice asupra celulelor microorganismelor fitopatogene. Primul compus *fitoalexinic* identificat a fost izolat și caracterizat în anul 1960, de către un colectiv condus de *Müler*, și a fost denumit *faseolină* (după *Strange*, 2003).

În procesul de recunoaștere al unui agent patogen, de către celulele potențialei plante gazdă, respectiv în sinteza de *fitoalexine*, *elicitorii* sunt direct implicați. La locul atacat, în celulele gazde, la nivelul biomembranelor se declanșează o luptă între *elicitorii* care cauzează dezlănțuirea unora sau a mai multor mecanisme de *interceptare* a acestora de către *receptorii de membrană* ai celulei infestate, în urma căreia se nasc reacții diverse de apărare, mai mult sau mai puțin specifice. Modificările biochimice declanșate de infecția sau de atacurile provocate de către agenții fitopatogeni (complexitatea acestora, localizarea și gradul lor de extindere) – fenomene manifeste imediat sau în timp – constau nu numai în demararea sintezei de *fitoalexine*, în celulele infestate, ci și biogeneza de *fenoli*, de *lignină*, de *suber* etc.

În zonele atacate de agenții, lupta dusă de plantele infestate cu paraziții fitopatogeni se desfășoară la nivel celular și molecular, și este focalizată fie în direcția inactivării *fitotoxinelor*, fie este calată pe concentrarea în perimetrul respectiv a *fitoalexinelor*, fie pe orientarea reacțiilor moleculare înspre interpunerea de către organismul sau organul invadat, de bariere mecanice, de natură suberoasă, dispuse între țesuturile vegetale și agentul infestat, suberina depunându-se în interstițiile microfibrilelor pectocelulozice, proces menit să stăvilească diseminarea microorganismelor dincolo de baricada elaborată de țesuturile vii, impermeabilizând peretele celular în zona de acces a patogenului.

BCU BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Fitoalexinele, în celulele parazitate, reprimă capacitatea de răspândire a agenților fitopatogeni, prin acțiunea inhibitoare exercitată de către acestea la nivelul plasmalemei.

Unele *fitoalexine* pot preexista în plante, dar în cantități mici, ele reprezentând o reacție a celulelor la stresul provocat acestora de către variați factori abiotici. Dar, de cele mai multe ori, *fitoalexinele* sunt sintetizate în celulele din imediata apropiere a zonei atacate, în momentul producerii infestării și a invadării organelor de către agentul fitopatogen. Factorii de mediu pot influența, și ei, cantitatea și calitatea *fitoalexinelor* produse în celulele atacate, iar factorii endogeni – fiziologici, precum și *patotoxinele* eliberate de către agenții fitopatogeni – pot condiționa *natura* și concentrația acestora. Cu toate că natura chimică a *fitoalexinelor* este variată (unele dintre ele fiind compuși fenolici de tipul faseolinei, fie al scopoleinei, pisatinei, orhinolului, vieronei ș.a.m.d.), unii agenți fitopatogeni au capacitatea de a le dezactiva, în timp ce alții pot tolera prezența *fitoalexinelor* în celulele și țesuturile în care aceștia se află (*Strange*, 2003).

La locul atacului, celulele invadate de către agenții fitopatogeni pot produce și *inhibitori enzimatici*, cum sunt cei de tip proteazic. Viteza de răspândire a unei infecții, în general, va depinde nu numai de capacitatea plantei atacate de a produce *alexine*, sau *antiproteine* (antipatogene, cum sunt *antifitotoxinele*, inhibitorii proteazici etc.), ori de substanțe destinate barării răspândirii patogenilor în corpul acestora, ci și de mecanisme care vizează generarea de *lizine*, ce descompun peretele celular al fitopatogenului sau, dimpotrivă, declanșează lignificarea, suberificarea și/ori silicifierea pereților pectocelulozici ai celulelor vegetale, reacții de mai lungă durată, care se produc în timp. Astfel de compuși sunt meniți să localizeze microorganismele la „poarta" de intrare a lor în potențialul organism gazdă. Lupta declanșată între celulele și țesuturile plantelor, și agentul fitopatogen, este de durată și se traduce prin producerea în organismele vegetale a unor modificări mai mult sau mai puțin profunde, petrecute în plan morfoanatomic, fiziologic, metabolic, ultrastructurat și molecular.

Pe lângă cele arătate, mecanismele de răspuns ale celulelor afectate de invazia agentului patogen, la nivel *molecular*, constau și în generarea în zona atacată a sintezei de compuși organici speciali, cum sunt: *fenolii*, *alcaloizii*, *uleiurile eterice*, *glicozidele*, *glicoproteinele*, *taninurile*, *fitoncidele* etc., substanțe care pot să joace un rol hotărâtor în limitarea extinderii infecției în organul infestat și care se încadrează în categoria *produșilor secundari de metabolism* (*Strange*, 2003).

Numeroase studii au servit la descoperirea sau crearea de genotipuri vegetale, care grație produșilor secundari de metabolism pe care îi sintetizează acestea, fac imposibilă penetrarea și răspândirea unui parazit în corpul lor.

Tehnicile de inginerie genetică au în vedere multiple scopuri. Unele dintre acestea au ca țintă nu numai generarea sau selectarea de genotipuri rezistente morfoanatomic la anumiți agenți fitopatogeni, ci și la *fitotoxinele* lor. *Ingineria genetică* reprezintă una dintre modalitățile biotehnologiei moderne de prevenire sau de limitare a pagubelor produse de atacurile fitopatogenilor asupra culturilor agricole.

În cazul ***simbiozelor*** realizate între plante și bacterii, sau ciuperci, *colonizarea* de către acestea a unor celule sau țesuturi vegetale poate fi patologică doar într-o fază inițială de atac; treptat, agentul colonizant devine tolerat de plante, iar, în timp, reacția se transformă într-o relație reciproc avantajoasă atât pentru celulele gazde, cât și pentru microorganismul instalat în organul sau în organismul infestat.

Atacul *fungic* este, cel mai adesea, provocat de *sporii* acestora. După ce sporii germinează, ei dau naștere la *hife*, formațiuni filamentoase pluricelulare, care în momentul atacului trebuie să penetreze variatele „*bariere*" biologice prezente la nivelul organelor plantelor sau a celulelor vegetale, proces urmat de înaintarea treptată a acestora în interstițiile țesuturilor plantelor gazde.

La paraziții de tip *endocelular*, cum este cazul miceliului *fungic*, pătrunderea acestuia în interiorul celulelor realizează ceea ce se numește o *infecție intracelulară*. Extinderea infecției în planta atacată va depinde de rezultatul luptei purtate între planta invadată și agentul patogen invaziv, ale cărui capacități de multiplicare, de creștere, de propagare și de infestare vor fi condiționate, în primul rând, de *compatibilitatea* dintre sporii (respectiv atacant), și potențiala plantă sau organ gazdă. Dacă biomediul corespunde susținerii germinației sporilor și înmulțirii celulelor agentului fitopatogen, consecințele vor fi dezastruoase pentru organul și, ulterior, pentru planta atacată.

Dar, *exprimarea patogenității* și *intensitatea atacului* sunt fenomene care nu depind numai de o multitudine de reacții endocelulare, cum sunt cele de *rezistență* ale celulelor vegetale la atacul patogenului, ci și de *transcripția* în celulele plantelor gazde – la nivelul receptorilor de membrană – a „*mesajelor*" transmise de genele patogenilor (inducându-se – într-o măsură mai mare sau mai mică – manifestarea oponenței endogene, care să limiteze sau chiar să eradicheze atacul provocat prin sintetizarea de agenți de apărare), proces care se continuă cu *vehicularea* germenilor în planta atacată,

transportarea semnalelor de infestare prin intermediul simplastului, şi *perceperea* acestora graţie comunicării intercelulare realizate la nivelul *plasmodesmelor*. Toate acestea, sunt fenomene care joacă un rol hotărâtor în diseminarea bolii în organul sau în organismul atacat. Dar, aceste fenomene se află sub directa influenţă a factorilor *externi*, cum sunt: lumina, umiditatea, uscăciunea şi temperatura (din aer sau din sol), calitatea nutriţiei minerale, şi altele.

Factorii externi pot facilita sau pot inhiba răspândirea bolii, atât diseminarea germenilor în natură, cât şi a agentului fitopatogen în interiorul plantei. Totodată, condiţiile de mediu pot intensifica ori pot scădea reacţia de apărare a plantelor, precum şi unele procese fiziologice, nu numai a respiraţiei şi a transpiraţiei, ci şi sinteza de compuşi meniţi să stăvilească atacul odată produs. La acestea se adaugă *tratamentele* aplicate plantelor cu diferiţi factori abiotici, chimici, cum sunt D-fenilalanina, acidul poliacrilic, acidul salicilic, şi alţii, menite să sporească rezistenţa plantelor la unele boli. Astfel, se cunosc o serie de compuşi de sinteză care au proprietăţi antifungice ori bactericide. Aceste substanţe, aplicate plantelor sub formă de soluţii sau de pulberi, vin în sprijinul lor, servindu-le ca tratamente fitosanitare preventive sau curative, care uneori ajută la salvarea producţiilor agricole. Dar, în cadrul agriculturii ecologice aceste măsuri agrofitotehnice nu sunt agreate de consumatori, întrucât o parte dintre compuşii fitoterapeutici administraţi plantelor se acumulează nu numai în sol, ci şi în corpul acestora şi, ulterior, în cel animal sau în cel uman. În consecinţă, rezolvarea unor astfel de neajunsuri se află tot în *ameliorarea rezistenţei plantelor* de interes economic la boli, *selecţia* fiind operată în regim de vitrocultură.

Evaluarea *reacţiei* plantelor, a *rezistenţei* sau a *sensibilităţii* acestora la atacul unor agenţi fitopatogeni (mai puţin a acelora simbionţi), presupune efectuarea de studii complexe referitoare la asocierile şi corelaţiile posibil de realizat, sau a celor improbabile, precum şi depistarea insensibilităţii sau a sensibilităţii, ori a hiperreacţiilor, sesizabile macro- sau microscopic, în funcţie de *gen*, de *specie* sau de *genotip*, atât în ceea ce priveşte *agentul atacat*, cât şi al *plantei* infestate. Studiile în acest domeniu au fost direcţionate nu numai înspre selectarea şi crearea de organisme vegetale rezistente la anumiţi agenţi cauzatori de boli, ci şi spre regenerarea din astfel de plante, *in vitro*, de clone care după transferarea lor *ex vitro* să se poată integra condiţiilor naturale de viaţă.

Studiile de evaluare a rezistenţei plantelor la atacurile patogenilor au captat atenţia cercetătorilor din domeniul *fitobiotehnologiei*, încă din epoca de pionerat a culturilor de ţesuturi şi celule vegetale. Investigaţiile au fost completate cu analize vizând cunoaşterea reacţiilor observate în cazul ope-

rării *in situ* sau *in vitro* de *grefe* tisulare, efectuate cu țesuturi bolnave implantate, pe de o parte, fie în țesuturile sau organele sănătoase, fie în organismele suferinde de atacuri produse de variați agenți fitopatogeni, fie în condițiile infestării artificiale a fitoinoculilor cu diferiți germeni, în regim de *cocultură*.

Este lesne de înțeles că, în elucidarea etiopatologiei parazitozelor la plante este necesară o abordare *multidisciplinară* a cauzelor producerii bolilor, precum și a modului de combatere a acestora. Prin cunoașterea cauzelor bolilor, și prin înțelegerea mecanismelor de reacție, a naturii contactelor care se stabilesc între gazdă și agentul atacator, s-a reușit efectuarea de operațiuni de *inginerie genetică*, prin utilizarea de *vectori* endocelulari – plasmide sau lipozomi – ca transportori de gene, prin intermediul cărora să se insereze, în potențialele celule gazde, gene de rezistență, astfel încât să se creeze genotipuri vegetale insensibile (sau mai puțin reactive) la diferite maladii. În cadrul unor astfel de cercetări, țesuturile, celulele sau protoplaștii vegetali au beneficiat – în regim de vitrocultură, respectiv de *cocultură* – variate transformări, cele mai frecvente reușite fiind cele mediate de *plasmidele* provenite de la tulpinile de *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* sau *A. rhizogenes*).

Pe de altă parte, tot în regim de vitrocultură au fost efectuate experimente și studii referitoare la ***neoplasmul*** celular și la *tumorogeneza* declanșată la nivelul țesuturilor vegetale, respectiv a *cancerului la plante*, ca urmare a infestării lor cu unele specii de bacterii fitopatogene, cum este cazul tulpinilor de *A. tumefaciens*. Alte studii de acest tip se referă la investigarea, la plante, a fenomenelor de *oncogenitate*, de natură *fiziologică*. În această categorie intră *hiperhidria*, o boală cu caracter malign (supranumită *vitrificare*, într-o concepție mai veche), și *habituația*, maladie denumită și *anergism* (*Gautheret*, 1959), stări canceroase care sunt întâlnite frecvent în celulele și țesuturile unor fitoinoculi (mai ales la speciile de rosacee). Ambele stări de malignitate menționate anterior sunt manifeste în decursul perioadei de vitrocultură, au cauze endogene, și nu sunt produse de un atac fitopatogen. Aceste fenomene sunt încă în mică măsură cunoscute. *Hiperhidria*, manifestare prezentă la nivelul celulelor fitoinoculilor, a incitat atenția multor cercetători din domeniul biotehnologiei vegetale, întrucât această boală *neoplazică* aduce prejudicii importante industriei axată pe micropropagarea speciilor de interes economic, deoarece vitroplantulele atinse de această maladie neputând fi aclimatizate la viața *ex vitro*, pierderile cauzate de vitrificare afectează comerțul cu material săditor lipsit de viroze, clonat *in vitro*.

Tot un *neoplasm* vegetal este și cel de natură *genetică*. Fitoinoculii deținători de variate forme de *cancer* au fost, și sunt, utilizați în cercetările cu caracter fundamental, ca modele experimentale.

În general, zestrea genetică a plantelor primează ca importanță în ceea ce privește capacitatea acestora de a se apăra, *respingând* sau *nu* agresiunea unui agent fitopatogen. De aceea, în scop practic, prin vitrotehnici se încearcă crearea de soiuri cât mai rezistente la atacul unor fitoparaziți, plante ale căror reacții să se bazeze pe mecanisme de apărare de tipul structurilor morfoanatomice sau biosintetice; în acest ultim caz, este vorba de producere de către celulele plantelor, potențiale gazde, de compuși care să împiedice sau să anihileze atacurile agenților fitopatogeni, ori selectarea de genotipuri cu caracteristici speciale, organisme care, apoi, să fie clonate prin intermediul tehnicilor de micropropagare.

Rezistența plantelor la boli poate prezenta particularități individuale de reacție, în raport cu unele *specii* sau *rase* ale agenților fitopatogeni, remarcându-se – la anumite specii sau genotipuri vegetale – existența unor sensibilități diferite față de variații dăunători; alteori, la potențialele plante gazde se poate întâlni manifestarea unei rezistențe *nespecifice* la boli. La astfel de plante, reacția acestora la boli se manifestă doar atunci când atacul a fost produs de o anumită rasă (tulpină) de agent fitopatogen, răspunsul lor fiind interpretat ca o rezistență de tip *funcțional*.

Descifrarea mecanismelor implicate în determinismul genetic al rezistenței diferitelor specii sau soiuri vegetale la boli se constituie într-un factor *endogen* „cheie", al cărui descoperire preocupă în cea mai mare măsură pe amelioratorii și pe specialiștii din domeniul ingineriei genetice, îndeosebi în cazul cercetărilor care se întreprind pe modelele experimentale utilizate în regim de vitrocultură, studii care au ca țintă crearea de genotipuri cu rezistență sporită la atacul unor anumiți germeni fitopatogeni. Cunoașterea îndeaproape a predispozițiilor genetice ale potențialelor plante gazde, sau a relațiilor de parteneriat gazdă-parazit, poate servi la obținerea de succese în alegerea factorilor de presiune utilizați în procesele de selecție operate *in vitro*, agenți care trebuie aplicați în regim de vitrocultură, proceduri însoțite de trierea metodelor de investigare a calităților dobândite de noile genotipuri create fie prin tehnici de inginerie genetică, fie prin mutageneză.

Izolarea de linii celulare sau de calusuri rezistente la o anumită *patotoxină*, în regim de *vitrocultură*, poate conduce la regenerarea de plante care clonate, după aclimatizarea lor la viața *ex vitro*, sunt urmărite în câmpul de ameliorare, pentru a li se analiza reacțiile la infecțiile produse spontan, în cadrul natural, sau la cele provocate în mod artificial.

O altă cale avută în vedere în practicarea de *vitroselecții* este aceea a depistării de linii celulare care să ducă la regenerarea de plante cu reacții îmbunătățite în ceea ce privește prevenirea sau limitarea răspândirii patogenilor de la locul de producere al infecției, în restul plantei.

Reacția de *rezistență* a potențialelor plante gazde poate fi oligo- sau *poligenă*. Rezistența *oligogenă* este aceea care asigură o protecție completă a celulelor plantelor în raport cu acțiunea fitopatogenă a unei anumite rase sau genotip atacator, capacitate valorificată apoi în practicile agricole de selecție. Rezistența *poligenă*, spre deosebire de comportamentul mai restrictiv al rezistenței oligogene, este nespecifică, ea exprimându-se în mod egal, în raport cu *toate* genotipurile de agenți fitopatogeni. Acest tip de rezistență este durabilă, dar ea nu conferă plantelor o protecție completă împotriva atacurilor fitopatogene (*Isaac*, 1992).

În ceea ce privește *determinismul genetic* al rezistenței plantelor la boli, există variate teorii, dintre care ipoteza stabilirii între planta gazdă și agentul patogen de interacții, prin intermediul combinațiilor de gene (teorie conform căreia fiecărei gene de rezistență îi corespunde – la nivelul parazitului – o genă de virulență sau de avirulență), este cea mai frecvent acceptată de către specialiștii din acest domeniu de cercetare, ca fiind cea mai verosimilă. Genele responsabile de avirulența patogenului sunt dominante, iar cele care determină virulența sunt recesive. Această teorie nu ia însă în considerare complexele raporturi care se stabilesc între planta gazdă și parazit, și nici mecanismele biochimice și moleculare care încearcă să stăvilească boala (*Strange*, 2003).

Cu toate că plantele nu posedă un sistem imunitar de tipul celui de la om și animale, reacția de rezistență a organismelor vegetale la îmbolnăvire este apreciată ca fiind un comportament asemănător celui de *manifestare imunitară*. După *Strange* (2003), *Müller* și *Börger* (1940) au fost primii care au semnalat faptul că, plantele afectate de agenți fitopatogeni – cum este cazul atacului produs de tulpina virulentă a fungului *Phytophthora infestans*, la nivelul tuberculilor de cartof – protejează plantele provenite din aceștia de instalarea în ele a unei infecții cu linii mai virulente de *Phytophthora*, sau chiar de *Fusarium caeruleum*. Astfel, teoretic, o plantă care dovedește o rezistență absolută la boli nu poate fi colonizată cu nici un tip de agent fitopatogen, ea fiind considerată ca *imună* la astfel de atacuri. Dar, imunitatea organismului vegetal la boală trebuie să se manifeste nu numai la locul de atac, ci ea trebuie să fie prezentă în întreg corpul plantei. Mecanismele de reacție, respectiv de rezistență a plantelor sunt, adeseori, rezultatul îngemănării – în diferite grade – a diferitelor sisteme de apărare, ca o expresie a determinismului lor genetic.

Comportamentul celulelor, a țesuturilor, organelor, respectiv a plantelor atacate de către variații agenți fitopatogeni trebuie analizat atât preinfecțional, cât și postinfecțional. Rezistența *structurală preinfecțională* privește manifestări de reacție cu caracter morfoanatomic, ce țin de specificul

celulelor care alcătuiesc țesuturile de protecție și gradul de diferențiere a țesuturilor situate în profunzimea organelor, în timp ce, rezistența *biochimică* se exprimă prin prezența sau absența din celulele organelor plantelor atacate de dăunători a unor compuși chimici considerați speciali, de regulă preexistenți în plante (de tipul *produșilor secundari de metabolism*), care fie că *împiedică penetrarea* și *înmulțirea* agentului fitopatogen în celulele, respectiv în organele plantelor, fie *migrarea* acestuia.

Declanșarea unor reacții biosintetice *postinfecționale* constă în mijlocirea exprimării rolului *fitoalexinelor* ori/și prin manifestări de hipersensibilitate. În categoria rezistenței naturale, pasive, a plantelor la atacul fitopatogen, un rol major îl are nu numai *chimismul* celulelor, ci și valorile de *pH* ale sucului vacuolar, *presiunea osmotică* a acestuia (valori variabile – într-o plajă mai largă – la fructele verzi, în raport cu cele coapte), precum și cele referitoare la prezența *prohibitinelor* (de tipul acidului protocatecuic, a pirocatechinei, risitinei, vieronei, gosipolul și altele), a *alcaloizilor*, *glicozizilor*, *fungicidelor*, *fitoncidelor* etc. (*Isaac*, 1992).

În patologie, în general, unele maladii sunt *acute*, altele se manifestă sub formă *cronică*. Intensitatea unui atac depinde foarte mult nu numai de natura infecțiilor (simple sau complexe), ci și de măsura în care atacul este *mono-* sau *pluripatogen*, în ultimul caz intervenind și o competiție între diferiții agenți, în raport cu un anumit organ atacat, uneori manifestându-se chiar și fenomene de antagonism microbian. Aceste aspecte trebuie analizate și în funcție de *starea* fiziologică a plantelor supuse unei invazii fitopatogene, *fenofaza* în care se află plantele atacate și, nu în ultimul rând, *factorii ecologici* naturali, sau cei impuși experimental, în cazul regimului de vitrocultură.

Agenții patogeni pot manifesta o afinitate evidentă față de o unică specie, sau în raport cu un număr foarte restrâns de specii. Aceștia au fost numiți *monofitofagi* (de exemplu: *Plasmopara viticola* sau *Taphrina pruni*); alții, atacă specii vegetale care fac parte dintr-o aceeași familie (de exemplu de graminee), ce au fost denumiți paraziți *oligofitofagi*; fitopatogenii care îmbolnăvesc variate specii vegetale, ce aparțin la familii diferite, au primit numele de *polifitofagi*.

Cele prezentate au avut menirea să informeze cititorul cu privire la complexele probleme care se ridică în *patologia celulelor vegetale* și măsura în care raporturile stabilite între microorganismele ce colonizează un țesut (organ sau plantă), sau invadează o plantă gazdă și perturbă echilibrul biologic al organismului contaminat, precum și relațiile care pot interveni între cei doi, sau mai mulți parteneri, consecințele acestora asupra plantelor (lupta care se produce între atacant și atacator, pe ce plan etc.), aspecte care se

constituie în subiecte de studiu nu numai în fitopatologie și în ameliorare, ci și în fiziologia sau citologia plantelor bolnave, examinate în condiții naturale sau în regim de *vitrocultură*.

Cunoașterea reacțiilor la nivel celular sau tisular, de ordin morfogen, ultrastructural, citofiziologic și biochimic, a condus la marcarea de progrese importante în înțelegerea fiziopatologiei plantelor bolnave de una sau de mai multe maladii, atât în ceea ce privește *simptomatologia*, cât și *mecanismele moleculare* care sunt implicate în procesele de sesizare a atacului de către celulele infectate, natura *receptorilor* și a *transmițătorilor* de mesaje, factorii responsabili de declanșarea reacțiilor de *apărare*, și tipul acestora, *blocarea* și/sau *respingerea* agentului patogen etc.; aceste probleme se pun oarecum diferit în cazul *simbiozei*, situație în care între viitorii parteneri, în timp, se instalează relații de interdependență și de cooperare reciproc avantajoase. Caracterizarea unor astfel de relații, fie ele de tip simbiont fie, dimpotrivă, de blocare sau de anihilare a efectelor negative, fitotoxice, exercitate de către compușii cauzatori de boală (sau a celor pe care celulele cormofitelor îi folosesc în lupta lor împotriva unui atac fitopatogen), constituie subiecte care fac obiectul diferitelor experimente practicate *in vitro*, respectiv în *regim de cocultivare* a fitoinoculilor împreună cu un *parazit* sau agent simbiont.

Deci, cele două laturi majore care privesc posibilele relații ce pot interveni între microorganisme și plantele atacate, sunt cele de tip *patogen* și, în contrast cu acestea, sunt cele cu caracter *simbiont*. Ambele aspecte pot fi analizate din punct de vedere teoretic sau practic.

Una dintre aplicațiile practice ale cercetărilor teoretice efectuate în această direcție se referă la valorificarea capacității unor celule (respectiv organe ale speciilor de cormofite) de a interacționa de manieră *simbiontă* cu unele microorganisme, proces care conduce, în final, la o susținere a nutriției partenerului vegetal și la obținerea de producții agricole sporite. Nu în ultimul rând trebuie menționat și faptul că, prin *micorizarea in vitro* sau *ex vitro* a vitroplantulelor, operațiune executată înainte de amplasarea acestora în substratul septic, este posibilă creșterea randamentului în unitățile de micropropagare, proces care duce la ridicarea procentului de supraviețuire al exvitroplantulelor, în momentul transferării lor în mediul natural de viață.

Aplicarea în producție a studiilor din domeniul fitopatogenezei servesc la o diminuare, în unele cazuri, a poluării mediului ambiant, protejându-se astfel sănătatea umană și cea animală, evitându-se sau reducându-se la minimum tratamentele fitosanitare.

Într-o altă categorie se înscriu tehnicile de generare – în regim de vitrocultură – de material de plantat certificat ca fiind „liber de viroze", produs în unitățile de micropropagare.

1.2. MICROORGANISMELE FITOPATOGENE ŞI CELE FITOSIMBIONTE

Prin *microorganisme* (în l. greacă *mikros* = mic, iar *organismus*, în l. latină = organism, corp viu, organizat, prin metabolism şi reproducere, după *Váczy*, 1980) se subînțeleg organismele vii de dimensiuni *submicroscopice* (*virusurile*) sau *microscopice* (*bacteriile*, *drojdiile*, *mucegaiurile*, unele *alge* şi *protozoarele*), acestea din urmă, spre deosebire de virusuri au un corp organizat, metabolism şi reproducere. Apartenența *virusurilor* la categoria mare a microorganismelor este discutabilă.

În cele ce urmează, vom detalia câteva aspecte descriptive şi taxonomice privind microorganismele.

1.2.1. VIRUSURILE ŞI PARTICULELE VIRALE. CARACTERISTICI BIOLOGICE

1.2.1.1. Virusurile

La plante, ca şi la om şi la animale, *virusurile* produc boli grave, numite *viroze*. Multe decenii, virusurile au purtat numele de *inframicrobi*, de unde şi denumirea de *inframicrobiologie* dată disciplinei care studiază acest grup aparte de agenți infecțioşi.

Virusurile sunt sisteme acelulare, invizibile la microscopul optic şi lipsite de metabolism propriu.

Particulele virale se pot multiplica numai în celulele pe care acestea le parazitează.

1.2.1.1.1. Descoperirea virusurilor

Fitovirozele au fost descrise cu mult timp înainte ca agenții patogeni cauzatori de astfel de maladii să fie cunoscuți. Detalierea caracterelor biologice ale virusurilor s-a făcut abia în secolul XX, pe măsură ce au progresat tehnicile din domeniul microscopiei electronice. Cu toate acestea, la plante (de exemplu la frunzele de *Eupatorium*), simptomatologia unei boli virale a fost menționată în înscrisuri care datează încă din anul 752 d. Hr. (*Maxim* şi colab., 2002).

BIOLOGICAL UNIVERSITY LIBRARY

În anul 1720, *Crove* a semnalat existența la plantele din Olanda a unei maladii denumită *pătarea lalelelor*, suferință dovedită – în epoca modernă – ca fiind o viroză (*Maxim* și colab., 2002). *Cane*, în aceeași perioadă de timp, a demonstrat că transmiterea unor boli (de exemplu a „*pătării iasomiei*") se poate face prin *altoire* (*Pamfil*, 1999). Ulterior, *Mayer* (1885) a semnalat, la plante, marea contagiozitate a bolii denumită *virusul mozaicului tutunului* (VMT), maladie transmisibilă prin aplicarea pe suprafața frunzelor sănătoase a sucului extras dintr-un organism similar, suferind de viroza respectivă (*Maxim* și colab., 2002). Mai apoi, *Ivanovski* (1892) – cel care „a pus bazele virusologiei" (după *Pamfil*, 1999) – a confirmat și el infecțiozitatea sucului extras din frunzele de tutun bolnave de această maladie, capacitate care s-a menținut chiar dacă extractul respectiv a fost trecut printr-un filtru care a barat trecerea bacteriilor, fapt sesizat încă din anul 1889 și de către *Beijerinck* (fost coleg cu *Mayer* la Școala Agricolă din Wageningen). De altfel, în anul 1898, *Beijerinck* – considerat de *Lwoff* (1957) ca fiind adevăratul părinte al *virusologiei* – a publicat o lucrare în care a specificat faptul că boala denumită *mozaicul frunzelor de tutun* poate fi provocată de un „*vivum fluidum*", agent care – în cantități extrem de reduse (sub forma unui filtrat preparat din sucul extras din frunzele bolnave de simptomele caracteristice unei astfel de suferințe) – cauzează instalarea acestei parazitoze în frunzele sănătoase. El a fost primul care a utilizat cuvântul *virus* pentru a defini agentul care generează o atare maladie (*Maxim* și colab., 2002).

În anul 1935, *Stanley* a reușit să cristalizeze VMT, în scopul examinării acestuia la microscopul electronic. În urma cercetărilor efectuate de către el s-a putut demonstra că activitatea acestui virus se menține chiar și în stare cristalizată, descoperire pentru care savantul, în anul 1946, a fost onorat cu ¼ din premiul *Nobel*, acordat pentru cercetări de chimie (www.brainyencyclopedia.com/encyclopedia/t/to/tobacco_mosaic_virus.html).

Strange, în monografia sa publicată în anul 2003, a menționat faptul că, se cunosc aproximativ 700 de tipuri virale, care provoacă plantelor gazde (aparținătoare unor specii foarte variate) *fitoviroze*, cu urmări catastrofale.

1.2.1.1.2. Alcătuirea virusurilor

În frunzele puternic infestate cu virusuri, masa totală a particulelor virale poate reprezenta circa 10% din greutatea uscată a acestora (*Strange*, 2003).

Virusurile fiind sisteme acelulare, *ultrafiltrabile* (ce traversează filtrele care reține bacteriile), din punct de vedere chimic sunt alcătuite dintr-un

acid nucleic şi o proteină, care în regim de parazitism se comportă ca entităţi infecţioase ce se pot exprima numai în celulele vii.

În general, virusurile se deosebesc mult de microorganisme nu numai prin faptul că acestea sunt de 10 până la 100 de ori mai mici decât bacteriile, având dimensiuni submicroscopice de sub 1 μ (10^{-6} m), ci şi prin aceea că ele nu au metabolism propriu şi sunt lipsite de informaţia genetică necesară pentru a-şi sintetiza enzimele sau alţi compuşi organici de care acestea au nevoie, în existenţa lor. VMT este un virus mare, bacilar, de circa 300 mμ lungime (1 mμ = 10^{-9} m), ce face parte din categoria *macrovirusurilor*; alte virusuri, care au lungimi de 120-1720 mμ şi lăţimi de 10-20 mμ, sunt considerate ca fiind *microvirusuri*. Din punct de vedere morfologic, în general, virusurile au fie forme *alungite* (bastonaşe fexibile sau rigide), fie *sferice*, caz în care ele au un diametru de circa 17-130 mμ. Virusurile nu-şi produc singure energia necesară vieţii şi, din acest punct de vedere ele depind, în totalitate, de metabolismul celulelor pe care acestea le parazitează.

Virusurile nu cresc, dar fiind constituite din acid nucleic, care se replică, se multiplică şi pot suferi mutaţii.

În general, greutatea moleculară a virusurilor este foarte mare, aceasta fiind cuprinsă între 8-50 milioane de daltoni (D) (*Zarnea*, 1983).

Particula virală, denumită şi *virion*, este formată din două componente principale, morfologic diferite, respectiv din *capsidă* (în l. greacă, *kapsa* = cutie) şi din *genom* (*Pârvu*, 1996; *Pamfil* 1999).

Capsida, preponderent de natură proteică, conţine şi protejează genomul viral. Ea reprezintă aproximativ 63-95% din greutatea totală a virusului şi deţine capacităţi imunogene. Capsida este construită din subunităţi proteice denumite *capsomere*, a căror alcătuire este diferită de la un tip de virus, la altul. Dimensiunile şi formele acestora sunt determinate genetic. Morfologia virusurilor prezintă particularităţi şi în ceea ce priveşte existenţa, sau nu, la exteriorul capsidei, a unei anvelope numită „*peplos*", constituită din 1-2 învelişuri proteice, care joacă un rol major în fixarea acestora de potenţialele celule gazde. Virusurile lipsite de *peplos* se numesc virusuri *nude*.

Genomul viral este constituit (circa 5-37% din greutatea totală a acestuia) din acid nucleic, mono- sau bicatenar, fie el ADN (la dezoxiribovirusuri), fie ARN (la ribovirusuri), într-un acelaşi virus nefiind prezente, niciodată, ambele tipuri de molecule purtătoare de informaţie genetică. Acidul nucleic specific, purtător al informaţiei ereditare, este răspunzător de producerea infecţiei virale.

Cel mai frecvent, virusurile fitopatogene (circa 90% dintre acestea) sunt *ribovirusuri* monocatenare; un tip de virus cu genom ARN dublucatenar, care provocă maladii de tip tumoral, este VMT.

Cel mai mic genom riboviral – al hepatitei delta – este de 500 kD, alcătuit fiind din 1678 nucleotide.

Dezoxiribovirusurile sunt fie cu genom ADN dublu catenar (cum este virusul mozaicului conopidei), fie *geminivirusuri*, la care în capsidă se află o moleculă circulară de ADN monocatenar.

Există și virusuri lipsite de genom, denumite virusuri „*goale*". Ele sunt utilizate în replicarea informației genetice provenite din genomul altor virusuri, tipuri virale denumite ajutătoare (*helper*), care pot compensa și substitui disfuncționalitatea replicativă a virusurilor defective, lipsite de această funcție.

1.2.1.1.3. Proprietățile virusurilor

Virusurile *nu* pot fi cultivate pe medii artificiale, ci numai în celulele vii, în regim de *parazitism*.

În urma aplicării unor proceduri speciale, mai ales la unele virusuri fitopatogene, ele pot fi obținute și sub formă *cristalizată*.

Menținerea virulenței virusurilor, într-un extract celular, variază de la câteva ore (*virusul mozaicului european al porumbului* își păstrează virulența, într-o asemenea situație, timp de 24 ore), la 4 zile (la *virusul răsucirii frunzelor de cartof*), ori la 250 zile (la virusul „X" al cartofului: PVX), sau chiar timp de mai mulți ani (în cazul lui VMT) (*Strange*, 2003).

Virusurile, chiar și cele care provoacă fitoviroze, inoculate fiind animalelor determină formarea în corpul acestora de *anticorpi*; plasma separată din sângele lor – produs numit *antiser* – deține anticorpi care în prezența serului specific reacționează prin *aglutinare* (precipitare), respectiv atunci când el intră în contact cu virusul în cauză, reacție *antigenică* care este valorificată în diagnosticarea prin metode serologice a diferitelor viroze. În laboratoarele axate pe astfel de determinări, testul poartă denumirea de ELISA. Acest test permite obținerea de informații calitative și cantitative referitoare la natura unei infecții virale. În funcție de intensitatea atacului viral, de gradul de diluție al sucului extras din planta bolnavă și de vechimea extractului, în acesta se poate identifica prezența infecției virale și, eventual, natura virusurilor fitopatogene. În cazul virusului Y al cartofului (PVY), diluția extractului poate fi de 1/100, iar în cel al virusului VMT aceasta poate fi mărită la 1:1.000.000.

BCU'S CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În general, virusurile sunt *termosensibile*. Punctul de anihilare termică a activității virale poate fi determinat prin păstrarea extractului – în situația de față a celui vegetal – timp de 10 minute, la o temperatură minimă la care acesta își pierde total infecțiozitatea. Limitele termice de inactivare a particulelor virale depind de tipul virusului. În cele mai multe cazuri, valorile de temperatură la care se realizează inactivarea virusurilor sunt cuprinse între 55-57^{0}C. *In situ*, temperaturile de stopare a virulenței virusurilor depășesc 60^{0}C, valoare termică la care infecțiozitatea multor virusuri se diminuează la jumătate, în decurs de câteva secunde.

Temperaturile ridicate inactivează capacitatea de replicare și de circulație a virusurilor în plantele virusate. Astfel, prin aplicarea de tratamente *termoterapeutice*, cuprinse între 37^0 și 42^{0}C, se stopează atât multiplicarea virusurilor, cât și migrarea acestora. Studiile menționate au fost făcute pe tuberculi de cartofi, și pe meristeme apicale sau axilare (*Kassanis*, 1965; *Quak*, 1977).

Virusurile își pot pierde infecțiozitatea și sub acțiunea razelor X sau a celor ultraviolete (UV), ori a undelor ultrascurte, agenți fizici care exercită efecte secundare severe și asupra celulelor și țesuturilor plantelor.

Din punct de vedere *chimic*, virusurile sunt inactivate de alcooli, de acizi (azotic, clorhidric și chiar și de cel ascorbic), de soluții de dodecil benzen sulfonat de calciu (*Emultin*), și de alți compuși organici. Solvenții organici, de tipul cloroformului, a eterului și a n-butanului nu inactivează virusurile, motiv pentru care ei sunt utilizați în izolarea și purificarea acestora. În general, se apreciază că, în combaterea fitovirozelor tratamentele chimice sunt ineficiente (*Pârvu*, 1996).

Virusurile pătrunse accidental în corpul plantelor, prin *leziunile* produse acestora de către viețuitoarele care ajung în contact cu ele (de exemplu prin rănirea lor de către animalele fitofage sau de către om), de la acel nivel, încorporate fiind în celule, acestea migrează pasiv – pe căi variate – în țesuturile organismelor vegetale.

În natură, transmiterea virusurilor este făcută și prin intermediul *vectorilor* naturali. Accesibilitatea virusurilor în plante este mijlocită și de insectele polinizatoare, care transportă în florile sănătoase grăuncioarele de polen provenite de la florile plantelor bolnave de viroze, vehiculând astfel particulele virale în ovarele acestora, odată cu creșterea tubului polinic. Aceasta explică dece aproximativ o treime dintre virusuri se propagă prin tegumentele seminale, prin embrionii sau prin endospermul semințelor, din cauza particulelor virale prezente la nivelul ovulului ori a sacului embrionar, vehiculate fiind în acestea de către tubul polinic, pe parcursul procesului de fecundație.

Totuși, transmiterea virusurilor prin intermediul materialului semincer este un fenomen mai rar întâlnit, întrucât plantele puternic virusate nu generează semințe.

Purtătoare de virusuri sunt și organele care asigură înmulțirea vegetativă a plantelor, respectiv tuberculii, bulbii, butașii, marcotele și altoii, fapt important de cunoscut în practicile horticole, dar și în cele de vitrocultură.

O altă cale naturală de vehiculare a virozelor este prin intermediul fungilor din sol. De exemplu, la sfeclă, *Polymyxa betae* transmite boala numită *rizomanie*, iar hifele de *Synchytrium endobioticum* vehiculează virozele la cartof etc. Chiar și plantele parazite, cum este *Cuscuta*, pot transmite virozele de la o plantă la alta (*Strange*, 2003).

Unele virusuri, de exemplu VMT, PVX, și altele, pot fi vehiculate de la un organ la altul și de către muncitorii care întrețin culturile, prin simpla atingere a plantelor bolnave, pe parcursul executării lucrărilor agrotehnice curente.

Ribovirusurile, după pătrunderea lor în celulele vegetale, suferă un proces de *decapsidare*, eliberându-se astfel, în acestea, molecula de ARN, prin intermediul căreia se stabilește un contact strâns a lor cu elementele vii ale celulei gazdă. Cu ajutorul acesteia, ele își sintetizează ARN – polimeraza, enzimă de care virusul are nevoie pentru a-și realiza replicarea ARN-ului propriu, fază denumită de *adsorbție*, perioadă în care – timp de câteva ore – virusul nu mai deține capacitate infecțioasă. Ulterior, are loc *replicarea* genomului viral, apoi sinteza proteinei virale și constituirea morfogenetică a virusului.

Eliberarea virusurilor din celule se produce odată cu liza pereților pectocelulozici ai acestora. Circulația virusurilor prin planta vie – la nivelul celulelor parenchimatice, precum și în vasele liberiene (tuburile ciuruite ale floemului) – se face sub formă de ARN lipsit de înveliș proteic și de capsidă, prin intermediul *plasmodesmelor*. În vasele liberiene, virusurile nu se replică din cauză că, în floem, respectiv în tuburile ciuruite, celulele fiind anucleate sunt lipsite de acizi nucleici. Dacă prin intermediul plasmodesmelor celulelor obișnuite viteza de deplasare a virusurilor este de circa 0,1-0,3 mm/zi, în cazul vaselor liberiene circulația acestora, la nivelul citoplasmei, este de circa 0,6-1,5 mm/h. Prin floem, virusurile – de la punctul de penetrare a lor în plantă – sunt vehiculate pe distanțe destul de mari. Dar, prin vasele lemnoase, odată cu fluxul de sevă brută, respectiv dinspre rădăcină înspre părțile aeriene ale plantelor, virusurile sunt mai rar antrenate în circulația de „lungă distanță" (*Strange*, 2003).

Durata de timp scursă din momentul producerii infecției și până la apariția primelor simptome (altfel spus perioada de incubație a virusurilor în

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

celule), variază în funcție de mai multe condiții, începând cu natura plantei-gazdă, organul afectat, prezența sau absența altor boli în zona atacată, vârsta organismului vegetal, fenofaza în care acesta sau țesuturile atacate se află, și terminând cu *factorii de mediu* (temperatura ambientală, gradul de umiditate în sol sau în aer etc.). La VMT durata de incubație a virusului poate fi de câteva zile.

Învazia virală prezentă în celulele și în țesuturile plantelor, la nivelul organelor vegetale se traduce prin producerea unor sume de modificări morfofiziologice și anatomice complexe, cum ar fi: apariția pe frunze de pătări inelare, de necroze sau de atrofii (manifestări care se exprimă și prin disturbări metabolice declanșate în plantele gazde, mai ales în ceea ce privește echipamentul enzimatic, sau ca o consecință a creșterii activității clorofilazei, a invertazei, fenoloxidazei și a polifenoloxidazei), îngălbeniri ale frunzelor (ca urmare a fragmentării cloroplastelor, ceea ce face să descrească fotosinteza cu 50-60%), perturbarea raportului carbon/azot în frunzele atacate, în urma creșterii concentrației de azot, consecință a faptului că frunzele bolnave prezintă un conținut sporit în proteine solubile, datorat existenței în acestea a unui intens proces de biogeneză de proteine virale, necesare multiplicării virusurilor etc.; alteori, pe plan ultrastructural, prezența virusurilor în celule determină o deformare a nucleilor și apariția în aceștia – sau în citoplasma celulelor bolnave – a unor corpi de incluzie, ori a unor formațiuni cristaline (fig. 1), sau amorfe, manifestări care servesc la identificarea tipului de virus instalat în celulele, țesuturile sau în organele atacate de una sau de mai multe viroze, în ultimul caz menționat tabloul transformărilor induse de atacul produs de poliviroze fiind mai complex. Totodată, la plantele virozate s-a putut remarca și declanșarea unei diminuări a biosintezei de fitohormoni, în unele situații – de exemplu în cazul atacului produs la tomate, de *virusul petelor de bronz* – procesul este secondat și de apariția fenomenelor de nanism.

Dar, se cunosc și plante la care simptomele de virusare nu sunt evidente, cum este cazul, de exemplu la unele culturi horticole, ori în cele de căpșun sau de cartof. Prezența în câmp a unor astfel de plante asimptomatice se constituie – în perimetrul respectiv – într-o permanentă sursă de infecții virale.

Este regretabil fatul că, virusurile fitopatogene au o capacitate ridicată de variabilitate genetică, ele suferind relativ ușor recombinări ale genomului lor, cu producerea de mutații, fenomene care conduc – în scurt timp – la generarea de noi tipuri virale, ce pot deține o abilitate infecțională sporită, mai ales în raport cu soiurile care până în acel moment au fost considerate ca fiind rezistente la atacul declanșat de o anumită tulpină virală.

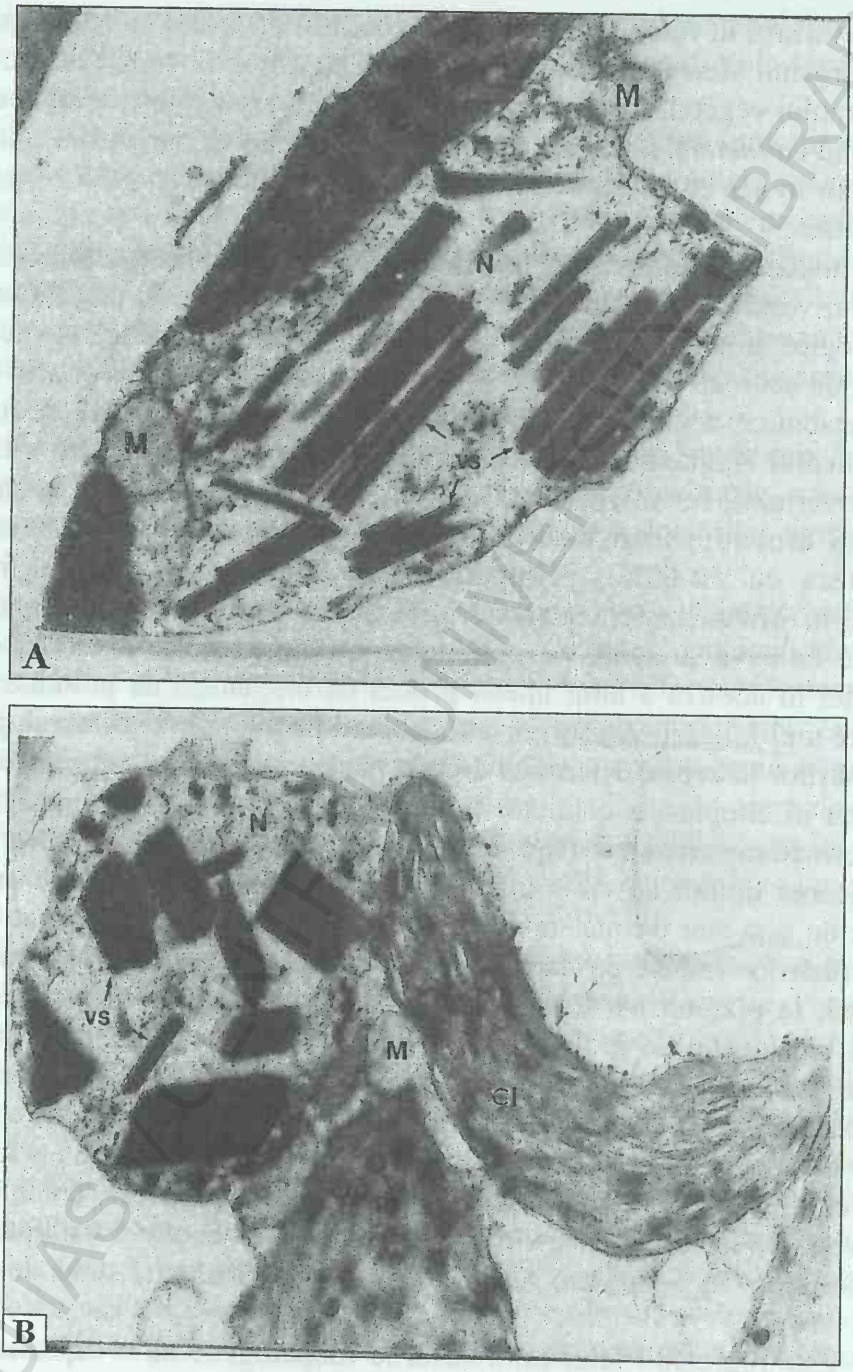


Fig. 1. Aspecte ultrastructurale surprinse în mezofilul foliar al plantelor de *Forsythia* adulte, cultivate în cadru natural (A) sau provenite de la vitroplantule (B); de remarcat formațiunile dreptunghiulare prezente în nucleu (N), posibile virusuri cristalizate (vs) (M – mitocondrii; Cl – cloroplaste; ps - plastoglobuli) (*Cachiță* și *Crăciun*, 1990).

BCU IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

1.2.1.1.4. Metode de identificare a naturii virusurilor cauzatoare de boli la plante

Studierea bolilor provocate de *virusuri* a stat nu numai în atenția fitopatologilor, ci și a biotehnologilor vegetali. Cercetările efectuate în această direcție au condus la elaborarea de microtehnici de prelevare a meristemelor apicale sau a celor axilare, cu predilecție caulinare, care în vitrocultură regenerează plantule libere de atac fitopatogen, implicit de virusuri, cu producerea de material de plantat perfect sănătos. Exvitroplantulele respective, după aclimatizarea lor la viața în mediul septic, sunt comercializate ca răsaduri. Actualmente, micropropagarea *in vitro*, la nivel industrial, se face pentru obținerea de material săditor utilizat la înființarea de plantații eradicate de dăunători, în special de viroze. În acest scop, semnalarea prezenței sau atestarea absenței atacului viral, în materialul vegetal donator de explante, ori în plantulele regenerate *in vitro* din culturile de meristeme (ca, de altfel, și identificarea naturii tulpinilor virale depistate în corpul plantelor mame, donatoare de meristeme, sau a celor neoformate *in vitro* din explante), joacă un rol major în practicile moderne de micropropagare. În urma trierii, materialul vegetal sănătos – de exemplu neoplantulele derivate din explante meristematice – se constituie într-o *vitrofitobază*, exemplarele vitrostocate fiind utilizate ca și *cap de clone* în procedurile de micropropagare practicate în industriile profilate pe astfel de tehnici de înmulțire vegetativă a plantelor de interes economic, cu precădere horticol.

Procedurile de *depistare* a fitovirozelor apelează, în mare măsură, la tehnicile generale de identificare a unor astfel de infecții în testările de acest gen efectuate la om și la animale, cum sunt metodele serologice (testele ELISA), cele imunoenzimatice, ori de microscopie electronică, sau cele care amplifică *in vitro* secvențele de nucleotide specifice, ori analizele electroforetice, sau metode care permit identificarea componenței învelișurilor virale de natură proteică etc.

În cazul organismelor vegetale, în scopul depistării și a diagnosticării virozelor, pot fi utilizate și *biotestele*, respectiv *plantele indicatoare*, cărora prin mijloace mecanice (rănire sau, mai rar, prin injectare) le sunt administrate eșantioane de extracte vegetale preparate din organele, respectiv din țesuturile supuse examinării.

În foarte multe cazuri, infecțiile *virale* nu sunt simple, ci complexe, ele fiind polivirale sau mixte, întrucât în organismele bolnave este posibilă existența în paralel, pe lângă aceea a atacurilor virale și prezența unor contaminări cu *bacterii* sau cu *fungi*, simptomele vizibile macroscopic nefiind întrutotul relevante. Chiar și cu tehnicile performante de care dispun labora-

toarele bine dotate din zilele noastre, pentru o diagnosticare exactă a naturii infecțiilor virale, adeseori, este indispensabilă efectuarea de studii comparative, complexe, executate în paralel cu diferite metodologii de lucru, deoarece cunoașterea unor astfel de detalii este deosebit de importantă, mai ales atunci când se impune luarea de măsuri de carantină, întrucât, uneori, în momentul examinării plantelor, aparent acestea pot să pară sănătoase.

Infecțiile virale fiind de tip sistemic, combaterea lor prin metode curative este ineficientă.

Testele de identificare a virusurilor pot fi categorisite fie ca *bioteste*, fie ca teste *serologice*, sau ca teste de factură variată, cum sunt cele *imunoenzimatice*, examinări *electronomicroscopice*, *tehnicile moleculare*, *termografie* etc. (*Maxim*, 2002).

1.2.1.1.4.1. *Biotestele*

Biotestele vegetale se referă la diagnosticarea fitovirozelor prin intermediul modificărilor surprinse la nivelul frunzelor unor *plante indicatoare*, ale căror reacții sunt relevante din acest punct de vedere. În cazul fitovirozelor, se impune luarea în considerare a câtorva particularități de manifestare a bolilor virale, simptome de care trebuie să se țină seama în interpretarea și în evaluarea relevanței atacurilor produse la nivelul materialului vegetal utilizat ca biotest.

Biotestele vegetale se practică, cu predilecție, pe specii erbacee, mai rar pe esențe lemnoase. Cel mai adesea, în fitovirusologie, ca bioteste se aleg speciile: *Chenopodium amaranticolor* sau *C. quinoua*, *Saponaria vaccaria*, *Silene armeria*, *Antirrhinum majus*, și altele. Pentru o corectă biorelevanță, plantele indicatoare trebuie să fie cultivate în spații protejate.

Întrucât, *virusurile* nu au capacitatea de a liza peretele pectocelulozic al celulelor vegetale, precum o au *bacteriile* sau *fungii* fitopatogeni, inocularea lor în țesuturile plantelor test, în care agenții virotici pot să se „*exprime*", se face prin rănirea organelor acestora.

Dacă la testările practicate pe specii erbacee aplicarea extractului preparat din plantele supuse operațiunilor de analiză se efectuează pe suprafețe foliare lezate cu o pulbere abrazivă, de tip *celită*, în cazul speciilor lemnoase diagnosticarea diferitelor boli virale se poate face, cu precădere, prin *grefarea* unui altoi, prelevat de la o plantă presupusă a fi virusată, pe o plantă test. Spre deosebire de majoritatea plantelor erbacee, speciile lemnoase, în general, dețin un conținut ridicat de taninuri (sau de alți compuși), care pot inhiba dezvoltarea virusurilor, respectiv manifestarea infecțiilor virale. Pentru prevenirea acțiunilor antioxidante sau reducătoare exercitate

BUAV CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

de către unele enzime, cu efecte inhibitoare asupra dezvoltării virusurilor sau a manifestării virulenței acestora, prepararea extractului din materialul vegetal supus analizei trebuie făcută în anumite condiții. Astfel, pentru evitarea inactivării particulelor virale, extracția – respectiv triturarea materialului vegetal – se va opera în prezența unei soluții de tampon fosfat pH 7-8. Alegerea pH-ului se va face în dependență de particularitățile speciei supusă testării, respectiv a pH-ului sucului vacuolar al acesteia, dar și în funcție de natura tulpinii virale bănuite a fi prezentă în celulele plantelor, întrucât există și virusuri sensibile la anumite valori de pH, proprietate care servește, adeseori, la identificarea și izolarea unor specii sau tulpini virale.

În scopul prevenirii acțiunii antioxidante sau reducătoare a enzimelor prezente în sucul extras din organele plantelor supuse testărilor, se recomandă adăugarea în mediul de extracție a polivinilpirolidonei (PVP), sau a dietilcarbonatului de sodiu (DIECA), ori a acidului tioglicolic, sau a p-nitrofenolului. La plantele lemnoase, prezența taninurilor în celule impune introducerea în mediul de extracție și a 3% albumină.

În cazul operării extracției din fragmente de organe (constând din frunze tinere ori din petale), sau din polen, triturarea trebuie făcută în prezența unei mici cantități de nisip de cuarț, ori a unor particule de sticlă sau de celită. Omogenatul realizat va fi filtrat (prin vată de sticlă, ori prin tifon, și în final prin hârtie de filtru), iar sucul obținut, respectiv extractul, va fi aplicat pe organele plantei indicatoare rănite în prealabil, cultivată fiind în spații protejate. De regulă, în acest scop sunt utilizate frunzele, care fie pot să rămână atașate tulpinilor cărora le aparțin, fie acestea sunt detașate și trecute în incinte închise, amplasate fiind în tăvi cu perlită umidificată cu apă aflată la temperatura camerei și acoperită cu hârtie de filtru; peste tăvi se aplică plăci din sticlă (fig.2A). Prealabil operării biotestărilor, este bine ca plantele indicatoare să fie trecute în regim de umbrire, timp de 1-2 zile, fie – după caz – să fie menținute la temperaturi de 36-37^{0}C, pentru a spori acuratețea reacției, respectiv sensibilitatea materialului vegetal la inocularea virusurilor în țesuturile lor (*Sandu*, 1998).

La garoafe, pentru efectuarea investigațiilor de testare, de la vitroplantule s-au recoltat frunzulițe (flacoanele de cultură fiind deschise în perimetrul hotei cu flux laminar de aer steril), care au fost mojarate (câte un mojar pentru fiecare probă) împreună cu cristale de celită, în prezența a 1 ml de apă distilată, sterilă. Extractul obținut a fost fitrat, după care câteva picături din el au fost aplicate pe suprafața fiecărei frunze test, de exemplu prelevate de la plante de *Chenopodium amaranticolor*, rănite în prealabil cu cristale de celită. Apoi, frunzele vor fi amplasate cu grijă, în poziție orizontală, dispuse cu partea ventrală a laminei pe suprafața hârtiei de filtru, așezată

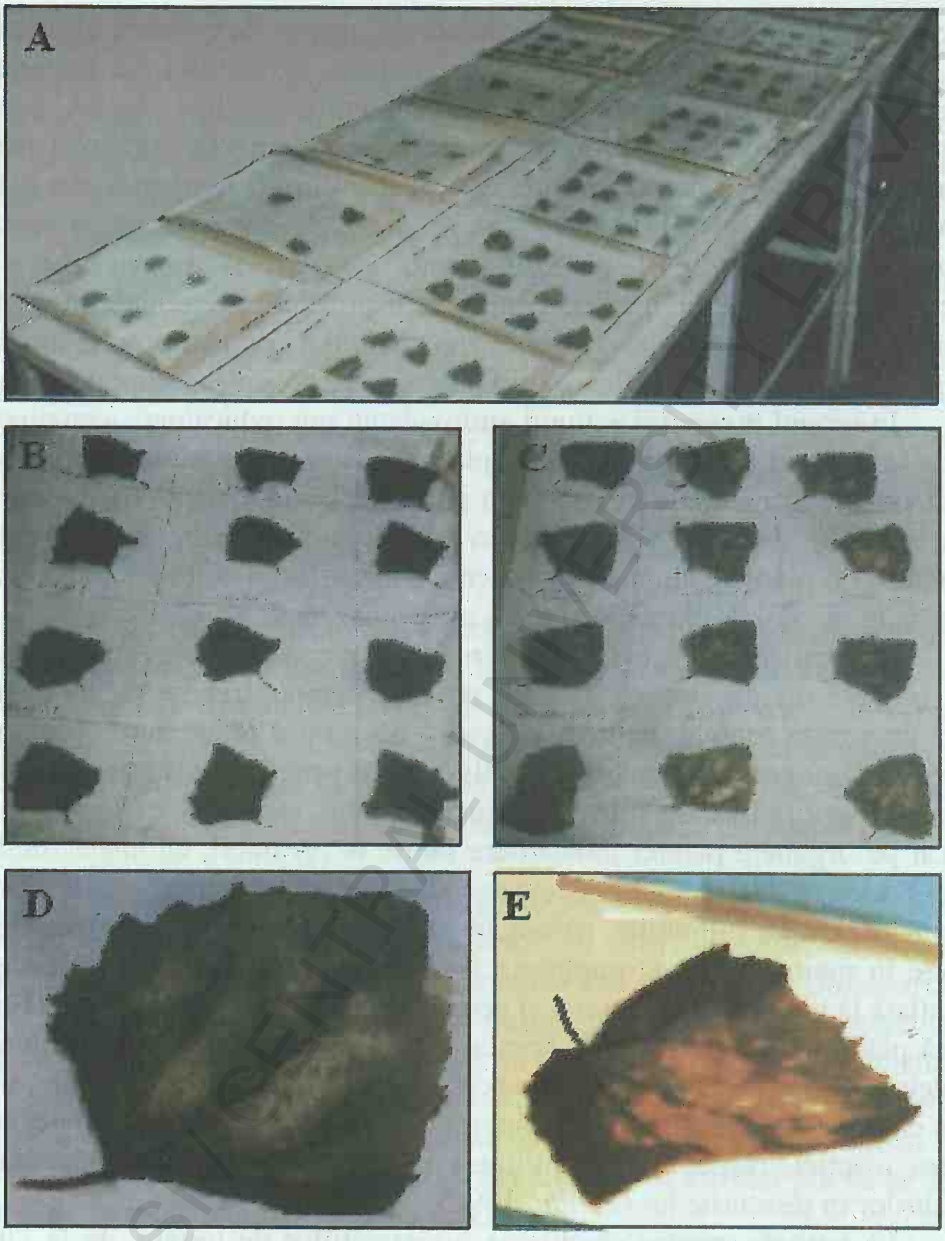


Fig. 2. Tăvi cu frunze de *Chenopodium*, inoculate cu extractul supus testelor, amplasate pe mese de laborator aşezate într-o încăpere destinată acestui scop, iluminate fiind continuu cu lumină fluorescentă, pe toată durata perioadei de incubație şi de manifestare a infecției virale (A); B – frunze normale, neinfestate; C-E – frunze infestate, la zece zile de la rănirea şi inocularea lor cu extract preparat din plante virusate; prezența virusului se manifestă prin pătări şi colorări caracteristice ale suprafeței limbului foliar (*Sandu*, 1998).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pe perlita introdusă în tăvi din material plastic, umidificată corespunzător cu apă, fără ca aceasta să băltească la suprafața hârtiei. Fiecare frunză test a fost amplasată pe hârtia de filtru, într-un careu marcat pe acesta cu creionul, purtând în el codul probei. Tăvile vor fi acoperite cu plăci de sticlă, după care acestea vor fi timp de zece zile expuse la temperaturi de 20-25^{0}C, la lumină continuă, fluorescentă. Periodic, pe parcursul celor zece zile, suprafața frunzelor trebuie pulverizată fin cu apă. După inocularea cu extract a fiecărei frunze, operatorul își va decontamina mâinile, prin ștergerea palmelor și a degetelor cu o soluție de fosfat trisodic 5% (compus cu acțiune antivirală), totodată înlocuindu-se și hârtia de filtru pe care s-au făcut operațiunile, cu o altă folie, care în prealabil a fost sterilizată termic.

Pe tot parcursul efectuării operațiunilor de testare, materialele și instrumentele cu care s-a lucrat au fost asepsizate. Inițial, sterilizarea s-a făcut prin autoclavare, iar, mai apoi, bisturiile au fost flambate, la fiecare reutilizare a lor. Periodic, suprafața de lucru trebuie ștearsă cu soluție de fosfat trisodic 5%.

Frunzele recoltate de la plantele test, cultivate în seră în condiții de izolare, amplasate în imediata vecinătate a laboratorului de examinare, până la utilizare vor fi închise în capsule Petri mari (sau în casolete), tapetate cu hârtie de filtru umedă, pentru a fi ferite de deshidratare.

Manifestarea bolii variază – ca număr de zile și ca intensitate – în funcție de *natura* plantei infestate, *vârsta* frunzelor folosite ca bioteste (de regulă fiind utilizate frunze tinere sau adulte), *condițiile* în care plantele indicatoare au fost cultivate, *specia* sau *tulpina virală* fitopatogenă etc. Astfel de studii servesc și la identificarea de specii vegetale care se pot constitui în gazde perfecte pentru înmulțirea variatelor tipuri de tulpini virale, plantele respective fiind necesare pentru prepararea de *antiseruri* reprezentative, indispensabile în operațiunile de testări serologice.

Biotestele permit evidențierea daunelor caracteristice provocate plantelor de către atacul cauzat de un anumit tip de virus, precum și de variatele tulpini virale, mai ales a acelora care se manifestă sub formă de cloroze, pătări, colorări sau necroze (fig 2C-E).

În cazul testărilor *virale*, efectuate în unitățile axate pe micropropagare, vitroplantulele care au prezentat reacții pozitive trebuie suprimate, preferabil prin incinerare.

Utilizarea fitotestelor în efectuarea indexărilor de rutină, prin vizualizarea infecțiilor *virale*, în unitățile specializate pe vitrotehnici de micropropagare a speciilor vegetale, sunt relevante atât în ceea ce privește indetificarea naturii fitovirusurilor existente în plantele mame donatoare de explante meristematice, cât și în plantulele regenerate din acestea (*Pop*, 1989).

Aspectele surprinse la nivelul frunzelor de *Chenopodium* au fost concludente după trecerea a minimum zece zile de la inocularea țesuturilor foliare cu ser, și incubarea probelor în condiții optime de replicare și diseminare a virusurilor în țesuturile acestora.

Tehnica de biotestare, descrisă anterior, a fost practicată cu succes pe frunze de *Chenopodium*, în laboratorul de testare virusologică a calității materialului vegetal produs la ferma de micropropagare a garoafelor din cadrul Serelor Codlea, Brașov. În tabelul 1 sunt prezentate tipurile de viroze și simptomele virale manifestate la nivelul frunzelor utilizate ca biotest, identificate la garoafele de seră de la unitatea floricolă Codlea, prin intermediul procedurilor detaliate anterior (*Sandu*, 1998).

1.2.1.1.4.2. *Testele serologice*

Tehnicile serologice au un grad ridicat de specificitate, ele fiind mai relevante în ceea ce privește identificarea agentului viral, nu numai ca prezență, ci și ca natură a tulpinii acestuia. Ele permit investigarea, cu mare exactitate, sincron, a mai multor probe.

Testele ELISA sunt cele mai comune tehnici utilizate în laboratoarele de identificare a prezenței în plante a infecțiilor virale. Principiul metodei constă în analizarea, prin proceduri speciale, a o serie de reacții care se produc în momentul stabilirii contactului dintre extractul ce deține virusuri (*antigenul*) și serul care conține *anticorpul* sau *anticorpii* specifici, prezenți în *antiserul* preparat în acest scop. Aceste teste, caracteristice tehnicilor cu care se operează și în laboratoarele de imunologie umană sau animală, au fost adoptate și extinse de către *Clark* și *Adams* (1976) și la analizele virusologice efectuate pe material vegetal. În cazul plantelor, *Clark* și *Adams* (1977) au perfecționat această metodă serologică, testul primind simbolul de DAS („*double antibody sandwich*") ELISA, procedură practicată actualmente în variate moduri. În corpul plantelor, prin astfel de investigații pot fi identificate și virusurile prezente în concentrații foarte scăzute, ele pretându-se chiar și la detectarea particulelor virale existente în vectorii purtători ai acestora. Pentru reușita unor astfel de teste, din plante trebuie să se obțină un preparat viral cât mai pur, care injectat (subcutanat sau intravenos) unui animal de laborator (cel mai frecvent, în acest scop, fiind utilizat iepurele), să inducă generarea în corpul acestuia a unei reacții imune. Ulterior, din sângele recoltat de la iepurele infestat cu particulele virale prezente în extractul vegetal, vor fi separate gamaglobulinele caracteristice, respectiv *antiserul* care va conține *anticorpii specifici* produși de către organismul iepurelui, sub acțiunea antigenului deținut de extractul injectat; antiserul specific,

Tabelul 1. Simptomele caracteristice principalelor tipuri de viroze evidențiabile pe frunzele plantelor utilizate ca bioteste în indentificarea virozelor la garoafe (*Sandu*, 1998).

VIRUSUL TESTAT	PLANTA – TEST	SIMPTOME PRODUSE DE VIROZELE GAROAFELOR LA NIVELUL FRUNZELOR PLANTELOR TEST
CARNATION VEIN MOTTLE VIRUS Virusul marmorării	*Chenopodium amaranticolor*	Leziuni locale clorotice, sau seminecrotice, cu centrul roșietic și cu halou clorotic difuz
	Chenopodium qinoua	Leziuni locale clorotice și infecție sistemică sub formă de pete nervuriene gălbui
	Saponaria vaccaria	Simptomele mozaicale slabe, ușoară piticire, care apar mai târziu și sunt mai grave
CARNATION RINGPOST VIRUS Virusul pătării inelare	*Chenopodium amaranticolor* și *qinoua*	Leziuni locale care apar după 2-4 zile de la inoculare
	Gonphrena globoza	Inele necrotice, cenușii, care apar după 2-4 zile de la inoculare, simptome urmate de pătări, marmorări și distorsiuni sistemice
	Tetragonia expansa	Puncte necrotice, alburii, apărute după 2-3 zile de la inoculare, urmate uneori de o infecție sistemică
	Saponaria vaccaria	Pete sau inele locale, cenușii, produse după 2 zile de la inoculare, în jurul cărora țesuturile se necrozează, fenomen urmat la 7 zile de simptome sistemice (mozaic nervurian, necrozări, distorsionări)
CARNATION ETCHED VIRUS Virusul pătării inelare gravate a garoafelor	*Saponaria vaccaria*	Pete necrotice, inele concentrice roșietice, sau pete, linii și inele galbene. Frunzele inoculate mecanic, menținute 12 ore la 10.000 lucși și la temperatura de 21-26^{0}C, după 10-13 zile de la inoculare exteriorizează infecții sub formă de linii și inele roșii, concentrice
	Silene armeria	Pete și desene lineare, necrotice, sistemice, produse la 2-3 săptămâni de la inoculare
	Chenopodium amaranticolor	Leziuni locale, necrotice, puțin numeroase

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

continuare tabelul 1

VIRUSUL TESTAT	PLANTA – TEST	SIMPTOME PRODUSE DE VIROZELE GAROAFELOR LA NIVELUL FRUNZELOR PLANTELOR TEST
CARNATION MOTTLE VIRUS Virusul marmorării garoafelor	*Chenopodium amaranticolor*	Leziuni locale, necrotice, urmate rar – în condiții de zi scurtă – de o infecție sistemică
	Chenopodium qinoua	Leziuni locale, clorotice și pete sistemice
	Atriplex hortensis	Pete locale, clorotice și pete sistemice
	Gomphrena globosa	Pete locate, necrotice, slabe și inele înguste de culoare roșie, fără infecție sistemică
	Saponaria vaccaria	Clorozarea nervurilor, piticire, marmorare și deformarea frunzelor
	Silene armeria	Simptome mozaicale slabe (greu de observat), ușoară piticire
CARNATION ITALIAN RINGSPOT VIRUS	*Antirrhinum majus*	Leziuni locale, necrotice
	Torentia fourmieri	Leziuni locale cu marginea roșietică și cu infecție sistemică
CARNATION LATENT VIRUS	*Chenopodium amaranticolor*	Leziuni locale, clorotice, de dimensiuni reduse și marmorare sistemică
	Chenopodium qinoua	Leziuni locale mici, de culoare gălbuie, urmate de marmorare nervuriană
CARNATION NECROTIC FLECK VIRUS Virusul pătării necrotice (streakul garoafelor)	*Saponaria vaccaria*	După 12-15 zile de la inoculare prin afide – clarifiere netă a nervurilor, răsucirea frunzelor tinere, piticire accentuată, însoțite de îngălbenire generală și distrugerea plantelor
	Silene armeria	Leziuni mici, de culoare verde pal, paralele cu nervura centrală
CARNATION WHITTE RING VIRUS Virusul pătării cenușii	*Saponaria vaccaria*	Pete inelare, neconcentrice, de culoare alburie

astfel obținut, va servi la identificarea și evaluarea reacției înregistrate în momentul în care el ajunge în contact cu antigenul specific, cel care a determinat producerea de anticorpi. Suspensia virală preparată din plantele supuse testărilor, prealabil injectării ei în animalul de laborator (în cazul de față în iepure), trebuie condiționată astfel încât aceasta (în calitate de antigen) să stimuleze generarea în animalul de laborator – inoculat cu extractul vegetal – a cât mai mulți anticorpi specifici, care se vor constitui în *antiser*. Testele de evaluare a reacției *serologice* se referă la urmărirea procesului de *floculare* ce are loc în momentul în care se stabilește contactul celor două medii,

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

respectiv dintre extractul vegetal şi antiser. Analizele pot să urmărească intensitatea acestui fenomen, gradul de *difuzie* în gel a celor două componente aflate în reacţie, precum şi formarea de precipitate la nivelul de contact al acestora; observaţiile se pot referi şi la examinarea fotometrică a *coloraţiei rezultate* în urma omogenizării celor două medii, respectiv a consecinţelor constatate în situaţia interacţionării moleculelor anticorpilor prezenţi în antiserul specific, cu antigenele existente în extractul vegetal supus testării. În acest ultim caz, dacă cele două componente ale reacţiei – antigenul cu anticorpul specific – sunt compatibile, la nivelul zonei de contact al acestora apare o coloraţie caracteristică, intensitatea ei relevând *prezenţa virusului* şi *natura tulpinii virale* identificată ca fiind cauza bolii.

În determinările fotometrice, proba martor este constituită din reacţia înregistrată la contactul produs între extractul preparat din material vegetal sănătos şi serului provenit de la animalul de experienţă. Pentru ca datele să fie considerate concludente, valorile extincţiei trebuie să fie de cel puţin două ori mai mari decât cele înregistrate la probele martor (pentru detalii vezi *Maxim* şi colab., 2002 şi *Strange*, 2003).

1.2.1.1.4.3. *Alte tehnici de punere în evidenţă a fitovirozelor*

În anii '70, *Derrick* (1973) şi, ulterior, *Milne* şi *Luisoni* (1977) au pus la punct o tehnică nouă de *microscopie imunoelectronică*, utilizată în studiile vizând evidenţierea prezenţei infecţiilor virale în extractele preparate din probele biologice. Astfel, prin intermediul microscopiei electronice a devenit posibilă folosirea ca antigen a extractului vegetal brut, cu un consum redus de antiser. Pe grila de electronomicroscopie, în calitate de „capcană" sunt aplicaţi anticorpii, peste care se administrează suspensia virală. Reacţia produsă se examinează la microscopul electronic.

O tehnică imunoelectronică îmbunătăţită, denumită *metoda decorării cu antiser*, a fost elaborată de către *Milne* şi *Luisoni*, şi publicată în anul 1977. Această tehnică este sensibilă atât la decelarea naturii virusurilor şi a gradului lor de înrudire genetică, cât şi la identificarea acestora în corpul vieţuitoarelor vectori.

Pentru efecuarea de studii de mai mare acurateţe, în ceea ce priveşte detectarea de variaţii apărute în populaţia de agenţi fitopatogeni prezenţi în ţesuturile vegetale (*fungi*, *drojdii*, *bacterii*, dar şi de *virusuri*), actualmente se utilizează tehnicile PCR („*polymerase chain reaction*"), de amplificare genică, pentru astfel de determinări fiind necesare extracte preparate din cantităţi infime (de ordinul miligramelor) de materialul biologic supus testărilor. Aceste metode se bazează pe hibridarea acizilor nucleici (ARN sau

ADN), diagnosticarea făcându-se prin intermediul unor „senzori moleculari", identificându-se apartenența şi specificitatea acestora, sonde care se calează pe anumite secvențe ale genomului viral pe care le recunosc prin tehnici de amplificare a secvențelor de nucleotide specifice microorganismelor care ne interesează. Uneori, în detectarea patogenilor vegetali, pentru decelarea cu mai mare acurateță a agenților înfecțioşi, se combină tehnicile PCR cu cele ELISA (PCR-ELISA) (*Maxim* şi colab., 2002 şi *Strange*, 2003).

1.2.1.1.5. Combaterea fitovirozelor

Infecțiile *virale* fiind de tip sistemic, combaterea lor prin metode curative obişnuite este ineficientă. Totuşi, se cunosc trei modalități de combatere a virozelor, prin proceduri de *termo*terapie, de *chimio*terapie, sau prin tehnici de *bio*terapie.

1.2.1.1.5.1. *Termoterapia*

Kobus, într-o lucrare publicată încă în anul 1890, specifica faptul că, în Java, în anul 1889, culturile de trestie de zahăr – suferinde fiind de o boală virală – au crescut mai bine dacă butaşii inițiatori ai plantațiilor au fost păstrați, prealabil amplasării lor în teren, timp de 30 de minute, în apă încălzită la temperatura de 52^{0}C. Ulterior, această metoda a fost răspândită în întreaga lume, ca o practică curentă în combaterea virozelor vegetale (*Boxus* şi colab., 1995).

Mai apoi, *Kunkel* (1936) a descoperit că *termoterapia* – constând în încălzirea atmosferei din jurul plantelor, la temperaturi de 35-38^{0}C (pe o durată de 2-4 săptămâni), sau cu apă încălzită la 50^{0}C (tratament aplicat timp de 10 minute, materialului vegetal aflat în stare de latență) – conduce la o scădere a intensității infecției produse de boala denumită *îngălbenirea piersicilor*, maladie care, mai târziu (*Doi* şi colab., 1967; *Davis* şi *Whitcomb*, 1971), s-a dovedit a fi de natură *micoplasmică*.

Kassanis (1950) a fost primul care a descoperit că infecția virală ce producea răsucirea frunzelor de cartof a putut fi stăvilită printr-un tratament termoterapeutic aplicat la nivelul tuberculilor. Totodată, într-o lucrare publicată de el în anul 1965, acesta a precizat şi faptul că, eliminarea virusurilor printr-o expunere prelungită a plantelor infestate cu un astfel de agent fitopatogen la temperatura de 37^{0}C, poate fi datorată fie producerii în țesuturi, în decursul termoterapiei, de perturbații care împiedică desfăşurarea normală a unor reacții în corpul viral, fie distrucției virusurilor, fie stopării multi-

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

plicării acestora. Dar, după cum afirmau mai mulți autori (*Converse*, 1966, 1970; *Campbell* și *Best*, 1964 și *Dunez* și *Monson*, 1968), nu toate virusurile sau tulpinile virale, prezente în celulele plantelor, reacționează în același mod la tratamentele termoterapeutice. Uneori, pentru stoparea propagării virusurilor în interiorul plantelor bolnave este necesară aplicarea unui tratament termic de mai lungă durată (timp de luni de zile), cu temperaturi de 40^0C. *Durata termoterapiei*, *modul* de aplicare al acesteia și *temperatura* utilizată pe parcursul tratamentului, sunt parametrii care trebuie stabiliți în funcție de *specia* vegetală atacată, *gradul* de dezvoltare al plantelor, *tipul* organelor supuse tratamentului, *natura virusului* sau a *virusurilor* fitopatogene, și altele (*Posnette* și *Cropley*, 1958; *Chambers*, 1961).

Mellor și *Fitzpatrick* (1961), și ulterior *Larsen* (1974), au specificat faptul că, la căpșun și la măr, termoterapia – aplicată în regim termic fluctuant – s-a dovedit a fi mai eficientă în combaterea virozelor, mai ales în ceea ce privește atingerea, posttratament (comparativ cu situația întâlnită în cazul administrării în mod continuu de temperaturi constant crescute), a unui procent ridicat de supraviețuire a plantelor.

În general, termoterapia aplicată plantelor mame realizează, în vârfurile de creștere, o inactivare sau o inhibare a capacității de replicare a virusurilor (*Strange,* 2003); procedura exercită efecte favorabile în ceea ce privește regenerarea în regim aseptic de plante libere de viroze, la garoafe, căpșun, orhidee, cartof și la alte specii vegetale, în condițiile combinării acestei practici cu prelevarea, de la astfel de plante, de meristeme apicale sau axilare, caulinare (de circa 0,25 mm), care cultivate *in vitro* regenerează plantule libere de infecții, inclusiv de tip viral (fig. 3A și B). Actualmente, aceste practici au o largă răspândire în industria horticolă, mondială.

La pomii fructiferi, după *Boxus* și colaboratorii (1995), rezultatele înregistrate în obținerea de plante libere de viroze, în urma termoterapiei și a culturilor de meristeme, au fost slabe. Cu toate că *Baumann* (1972), prin aplicarea termoterapiei la zmeur, a înregistrat rezulate foarte bune în ceea ce privește procentul de reușită atins în eliminarea virusului „*raspberry vein chlorosis*", *Roux* (1987) nu a obținut o însănătoșire a plantulelor de prun, regenerate *in vitro* din meristeme, de agenții virali NRSV și de PDV, cu toate că acestea au fost prelevate de la plante mame tratate – timp de 2 sau 4 săptămâni – cu temperatura de 37^0C. Uneori, cu toate că tratamentele termoterapeutice efectuate în mediul septic nu s-au dovedit eficiente, administrate fiind vitroplantulelor de cireș atinse de agenții virali NRSV și PDV, acestea au condus la eradicarea virozelor amintite la vitroculturile menținute timp de 3 săptămâni la temperaturi de 32-34^0C, exemplare care au suportat, apoi, repicări repetate (*Deogratias*, 1987).

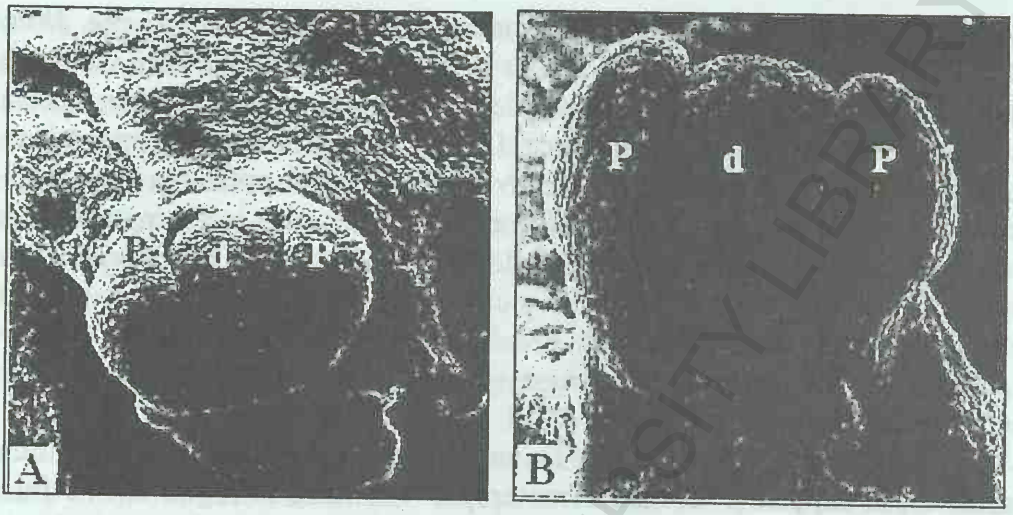


Fig. 3. A și B – Dom meristematic (d) și prima pereche de primordii foliare (P) văzute la stereomicroscop, în apexurile caulinare de garoafă (*Sandu*, 1998).

Toate unitățile biotehnologice axate pe micropropagarea plantelor de interes floricol, pomicol, a viței-de-vie, a cartofului, precum și a altor specii vegetale, dețin variate tipuri de incinte de termoterapie (fig. 4A). Acestea trebuie să fie dotate cu instalații care să asigure tratarea plantelor mame, donatoare de meristeme, cu condițiile ecofiziologice cerute de un astfel de regim termic, programat și reglat automat.

După instalarea vaselor de vegetație (fig. 4B), ce conțin amplasate în sol plantele mame care vor fi supuse tratamentului hipertermic, în incinta de termoterapie se va proceda la declanșarea sistemului de iluminare, fixat în tavan, programat în regim fotoperiodic de 16 ore lumină/24 ore și o intensitate luminoasă de circa 15000 lucși; creșterea temperaturii în incinta de termoterapie se va face cu o rată de 2^0C pe zi, până la atingerea pragului hipertermic cerut, în cazul garoafelor acesta fiind de 39^0C. La această temperatură plantele mame trebuie menținute timp de 45 de zile.

Pe durata termoterapiei, în camera de creștere umiditatea va fi păstrată constantă, în jurul valorilor de 60-80%.

Udarea ghivecelor cu plante mame se va face numai la nivelul solului, cu apă adusă la temperatura substratului din vasele de vegetație.

Vasele de vegetație trebuie să fie de construcție specială, cu pereți dubli între care să circule un agent frigorific (racordat la un sistem de pompare amplasat în afara incintei), măsură care are menirea să împiedice supraîncălzirea rădăcinilor plantelor. La exterior, vasele de vegetație trebuie să fie înconjurate de un manșon de spumă termoizolantă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

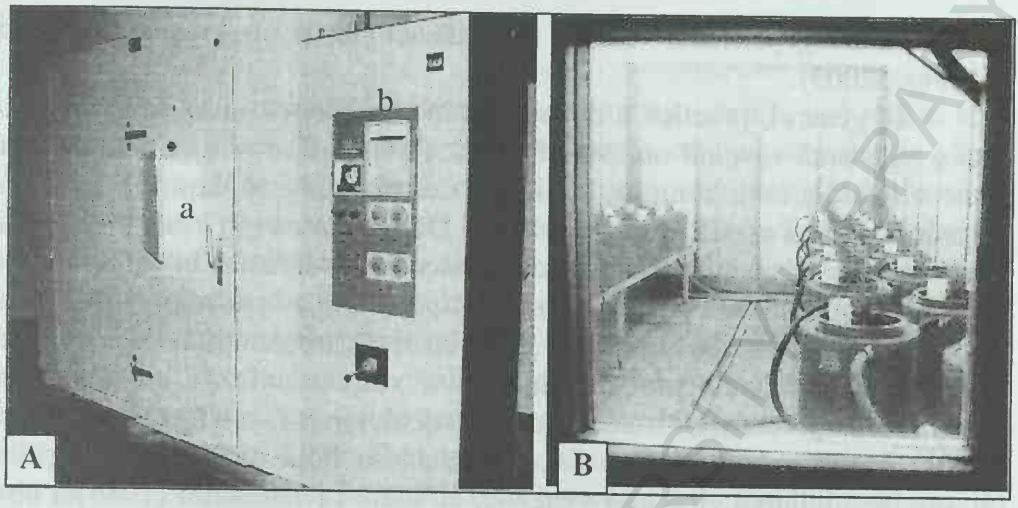


Fig. 4. Cameră de termoterapie, termoizolată şi automatizată, ce deţine un volum interior de cca. 20 m^3 şi o capacitate de 36 de vase de vegetaţie (cu înălţimea de 30 cm şi un diametru exterior de 22 cm); A – vedere din faţă a camerei de termoterapie (a – fereastră de supraveghere a incintei; plante mame amplasate în vase cu pereţi dubli, prin care circulă un agent frigorific; b – panou de comandă); B – mod de dispunere a vaselor de vegetaţie în interiorul camerei de termoterapie (*Sandu*, 1998).

În general, plantele mame suportă relativ bine regimul hipertermic, cu toate că – în funcţie de valorile de temperatură aplicate, de durata tratamentului, de specia vegetală supusă termoterapiei şi chiar de soi – se va înregistra o ofilire a frunzelor bazale şi o depigmentare a masei foliare, mugurii apicali şi cei axilari ai acestora rămânând însă viabili, iar explantele meristematice – de până la 1 mm – vor fi libere de infecţii virale. La garoafe, procentul de reuşită în obţinerea de plante sănătoase, prin regenerarea de vitroplante din astfel de meristeme, cultivate fiind pe medii aseptice adecvate ca şi compoziţie chimică asigurării unei optime creşteri a lor, a variat de la circa 4%, la soiul Flavio şi Citara, şi până la 50%, la soiul Monseigneur (*Sandu*, 1998).

1.2.1.1.5.2. *Chimioterapia*

În seva plantelor există numeroşi *compuşi antivirali*, sucul extras din unele plante medicinale inhibând replicarea particulelor virale (*György*, 1983). O serie de substanţe chimice, cum sunt acidul azotic, formaldehida, permanganatul de potasiu, şi altele, distrug ireversibil capacitatea de infecţiozitate a virusurilor. Dar, este regretabil că substanţele care stopează diseminarea infecţiilor virale (anihilând fie capacitatea virusurilor de a se rep-

lica, fie distrug particula virală), sunt dăunătoare și pentru plantele gazde (*Strange*, 2003).

În general, practica a dovedit că în combaterea virozelor, la plante, nici o substanță *viricidă* nu este eficientă. Atunci când este semnalată o acțiune viricidă a unui compus, eficiența acestuia poate să depindă nu numai de natura plantei gazdă, ci și de cultivar. După *Hansen* și *Green* (1983), tratamentele cu substanțe viricide reduc concentrația virusurilor în celule, dar ele nu sunt eficiente în eradicarea propriu-zisă a virozelor. *Ribavirina* (*virazolul* = 1-β-D-ribofuranosil-1,2,4 triazol-3-carboxamidă) este un compus care inhibă unele procese biochimice responsabile de blocarea unor vitrosinteze, precum și translocarea particulelor virale (*Boxus* și colab., 1995). Dar, aceasta nu poate fi considerată ca fiind un *viricid* cu aplicabilitate în anihilarea virozelor vegetale, cu toate că *Toussaint* (1985) a obținut unele succese în ceea ce privește suprimarea infecției cu *Odontoglossum ringspot virus* la orhideea *Cymbidium*, cultivată fiind *in vitro* pe medii cu adaos de 35 ppm *ribavirină*, asepsizarea substanței făcându-se prin filtrare, filtratul respectiv fiind adăugat în mediul de cultură sterilizat în prealabil prin autoclavare. Un astfel de tratament a putut fi aplicat numai pe durata a două subculturi, deoarece substanța respectivă, în timp, a prezentat fitotoxicitate. Totuși, cu această metodă, aplicată pe o durată de cinci ani, 90% dintre plantele de *Cymbidium* regenerate în regim de vitrocultură au fost libere de virusul anterior menționat (*Toussaint* și colab., 1993). Tot în anii '80, *ribavirina* – în concentrație de 250 ppm, administrată prin stropire, sau introdusă în mediile de vitrocultură – a condus, la plantele regenerate din explantele cultivate pe astfel de medii aseptice, la înregistrarea unei atenuări a intensității atacului viral și la estomparea simptomatologiei virale, mai ales la virusurile care, în general, afectează conținutul frunzelor în pigmenți asimilatori (*Cassells* și *Long*, 1980; *Hansen* și *Green*, 1983).

După *Maxim* și colaboratorii (2002), la pomii fructiferi, *ribavirina* s-a dovedit a fi eficientă și în eradicarea virusului CLSV.

Deogratias (1987) a fost de părere că *ribavirina*, la prun, inhibă multiplicarea virusurilor, dar nu anihilează activitatea acestora. Totodată, el a menționat și faptul că, la prun, un alt compus: *2,4 dioxohexahidro-1,2,3-triazina* poate exercita un efect viricid asupra particulelor de NRSV, dar ea nu manifestă o aceași acțiune și în ceea ce privește activitatea virusurilor CLSV și PDV (*Boxus* și colab., 1995).

Taninurile din sucul vacuolar al plantelor, mai ales a celor lemnoase, inactivează virusurile prin combinarea lor cu acești agenți patogeni, fapt care conduce la distrugerea particulelor virale (*Boxus* și colab., 1995).

1.2.1.1.5.3. *Bioterapia*

În practică, în scopul prevenirii unor atacuri *virale*, mai ales a acelora care sunt produse de tulpinile foarte virulente, ce sunt deosebit de păgubitoare, în special la organismele vegetale micropropagate, se apelează la utilizarea de proceduri de *protecție încrucișată* („*cross-protection*"), administrate potențialelor plante gazde, situație în care posibilele „victime" pot fi inoculate cu un specimen viral (tulpini) selectat astfel încât acesta să fie mai puțin virulent, ceea ce face ca o mutantă sau o suşe mai virulentă, aparținătoare aceleeaşi specii, în momentul infestării potențialei gazde să găsească „locul deja ocupat". Acest fenomen a fost semnalat, pentru prima dată, de către *Kunkel*, în anul 1936. Dar, trebuie acordată o mare atenție explicării unor astfel de tratamente, întrucât există pericolul potențial al producerii de infecții simultane, provocate de virusuri care să exercite o acțiune sinergică, a căror efecte însumate în loc să se contracareze, să conducă la înregistrarea de manifestări negative, severe.

Hiperparazitismul, precum şi *antagonismul* dintre diferiții agenți fitopatogeni, sau aşa numita „*imunizare*" a plantelor, intră în categoria măsurilor *bioterapeutice*. Astfel, în cazul unor virusuri profilate pe fitopatogeneză se practică o *preimunizare* a plantelor, cu specii sau tulpini hipovirulente, care dețin calitatea de a limita sau de a preveni infectarea organelor vegetale cu genotipuri mai virulente, imunizarea făcându-se chiar şi cu forme selectate aparținătoare aceluiaşi virus. Prin această procedură, la tomate s-a reuşit imunizarea plantelor împotriva atacului cu VMT (*Pârvu*, 1996).

În categoria *hiperparazitismului*, trebuie să avem în atenție şi faptul că, la plantele deja purtătoare de atacuri *virale* există şi cazuri de *micoparazi*tism şi de antagonism *bacterian*.

În biotehnologia vegetală, dar şi în virusologie, în general, *identificarea* virozelor prezente în corpul viețuitoarelor, ca infecții latente sau acute, se constituie într-un prim pas în interpretarea manifestărilor patologice sesizate fie la nivelul variatelor organe, fie la cel al întregului organism.

În general, în diagnosticarea maladiilor *virale* şi în luarea de măsuri de carantină, se ridică probleme multiple şi complexe referitoare la *natura* virusurilor responsabile de producerea de infecții, *gradul de răspândire* al bolii în plantă, dacă este vorba despre un *mono–* sau *poliparazitism*, *tipul* țesuturilor şi a structurilor afectate, *intensitatea* atacului, şi altele.

BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.2.1.1.5.4. *Obținerea „in vitro" de plante „libere de viroze", prin culturi de meristeme sau prin tehnici de microgrefare*

Limasset și *Cornuet* (1949) analizând la tutun, prin metode serologice, răspândirea *virusurilor* în corpul plantelor bolnave de *viroze*, au ajuns la concluzia potrivit căreia, cu cât ne apropiem mai mult de meristemul apical, concentrația acestora descreşte, în celulele vârfului vegetativ – la circa 50% dintre cazurile investigate – înregistrându-se absența totală a infecțiilor virusale. Pornind de la această descoperire, *Morel* și *Martin* (1952) au imaginat, la dalie, un experiment de prelevare și cultivare „*in vitro*" a meristemelor apicale, explantele fiind recoltate de la plante mame polivirusate. O parte dintre aceste explante meristematice, cultivate fiind *in vitro* au dat naştere, în câteva săptămâni, la vitroplantule de circa 1-2 cm lungime, care însă au fost lipsite de rădăcini; *grefând* astfel de plantule – libere sau nu de viroze – pe portaltoi constând din vitroplantule obținute din embrionii unor semințe germinate în condiții aseptice, din *altoi* au rezultat plante sănătoase. În anul 1955, autorii citați au reeditat succesul obținerii de plante libere de viroze, având – de această dată – ca donatoare de meristeme plante mame de cartof, virusate.

Ulterior, la unele specii, mai ales atunci când explantul meristematic a fost foarte mic, pentru reuşita cultivării domului apical – cu regenerarea din acesta de plante libere de viroze – *in vitro* s-au operat *microgrefări*. Eliminarea virusurilor la citrice, sau la piersic, a fost reeditată cu succes de *Navarro* și colaboratorii (1975), prin vitrografarea, respectiv altoirea explantelor meristematice pe vitroplantule provenite din semințe germinate în condiții aseptice. Tot prin astfel de tehnici de microaltoire, la piersic, *Mosella* (1979) și, ulterior, *Mosella* și colaboratorii (1980) au realizat – în procent de 57% – eliminarea virusului NRSV din lăstarii regenerați din asemenea meristeme.

O perfecționare a acestor tehnici a fost făcută de *Jonard* și colaboratorii (1983), care pentru a preveni apariția unor fenomene de oxidare a compușilor prezenți la nivelul unei lezări provocate prin incizarea țesuturilor vegetale, în cazul utilizării procedurii de microaltoire, au administrat, în zona traumatizată, un tratament local cu dietilditiocarbonat de sodiu, sau cu citochinină, compușii fiind încorporați într-o lamă de gelatină care a fost amplasată la locul de contact dintre altoi și portaltoi.

Deogratias și colaboratorii (1985) au precizat faptul că, un procent sporit de reuşită, de 40%, în eliminarea virusurilor NRSV și PDV, s-a înregistrat și în cazul în care apexurile *grefate* au provenit de la un material vegetal juvenil, ori din muguri latenți prelevați de la arbori adulți, celulele

acestora având un conținut mai scăzut în tanin. Dar, acest procent a putut fi mult îmbunătățit dacă apexurile grefate au provenit de la lăstari generați în condiții de vitrocultură. Însă, nicio plantă liberă de virusuri nu s-a obținut, în cazul în care apexurile grefate au provenit de la lăstari prelevați de la specii ierboase.

Wang și *Hu* (1980) au specificat faptul că, prin culturile de meristeme, practicate *in vitro*, la mai mult de 40 de specii vegetale au fost eradicate peste 70 de *viroze*. În plus, prin această tehnică, din explantele meristematice au fost regenerate și plante libere de *micoplasme*, de *bacterii* și de *fungi* (*Wang* și *Charles*, 1991).

Mecanismul prin care vitroplantulele regenerate din culturi de meristeme, apicale sau axilare (prelevate din interiorul mugurilor), sunt eliberate de atacul viral, este încă necunoscut. Există variate teorii care încearcă să explice acest mecanism, dar nici una dintre acestea nu este pe deplin convingătoare. În principal, virusurile vehiculate prin sistemul conducător al plantelor, nu ajung în apexurile caulinare sau radiculare, din cauză că țesutul vascular se diferențiază la o oarecare distanță de celulele inițiale și de domurile meristematice, între zona cu celule în activitate proliferativă și cea intrată în histogeneză interpunându-se un țesut nediferențiat, ale căror celule se află fie într-o mai lentă diviziune mitotică, fie în ele mitoza este sistată și celulele se găsesc într-un intens proces de creștere prin întindere. Așa se explică de ce, pe perioada termoterapiei porțiunile apicale și axilare se alungesc, iar virusurile rămân în zonele de anastomoză a vaselor conducătoare, în care agenții virali – din cauza temperaturilor ridicate – nu se mai replică.

Potrivit altei teorii (*Mellor* și *Stace-Smith*, 1977), în cazul excizării meristemelor și a cultivării lor *in vitro*, compușii traumatogeni ce iau naștere într-o astfel de situație blochează anumite enzime, care în mod obișnuit sunt prezente în celulele domului meristematic, ce sunt indispensabile virusurilor în decursul replicării lor. Acest fapt cauzează, dacă procesul este de lungă durată, o degradare a ARN-ului viral, produșii rezultați fiind asimilați de către celulele parazitate.

Boxus și colaboratorii (1995) au emis o ipoteză potrivit căreia accesibilitatea virusurilor în țesutul meristematic este împiedicată și de *lipsa plasmodesmelor* din pereții pectocelulozici ai celulelor care se multiplică; pe de altă parte, în țesuturile cu plasmodesme virusurile sunt vehiculate, de la o celulă la alta, prin intermediul punților de citoplasmă; după instalarea particulelor virale în interiorul celulelor gazde, în acestea se declanșează inițierea unei *competitivități* între celulele parazitate și virusuri, atât în ceea ce privește accesibilitatea fiecăruia dintre parteneri la moleculele necesare sintezei de nucleoproteine, cât și a utilizării acestora, postsinteză. În domul meris-

tematic, această luptă este câștigată de celulele gazde, care se află într-un proces intens de diviziune, fiind defavorizată replicarea virală, și astfel multiplicarea virusurilor este stopată (*Strange*, 2003).

O altă ipoteză, referitoare la tipul luptei care se instalează între celulele invadate de viroze și agentul invaziv, vizează posibila prezență în celulele prazitate a unor compuși sintetizați de către acestea, care să exercite efecte inhibitoare asupra replicării virale.

1.2.1.2. Viroizii

Plantele pot fi parazitate și de către microorganisme *subvirale*, care sunt particule patogene mai mici decât virusurile, ce dețin capacități de infecțiozitate. Astfel de particule poartă numele de *viroizi*. Ele sunt formațiuni acelulare, care posedă maximum 300 de nucleotide și au o alcătuire mai simplă decât aceea a virusurilor. Bolile provocate de viroizi sunt denumite *viroidoze* (*Strange*,2003).

Viroizii specifici plantelor sunt diferiți de cei care provoacă viroidoze la animale. *Maxim* și colaboratorii (2002) au fost de părere că, viroizii parazitează numai plantele, la om și animale neexistând maladii provocate de către astfel de particule.

Viroizii au fost descoperiți în anul 1967 și au fost descrişi, pentru prima dată, de către *Diener*, în anul 1970, izolați fiind din tuberculi alungiți de cartof, boala fiind denumită „*potato spindle tuber viroid*" (*Pamfil*, 1999). Aceste particule, lipsite de capsidă, au un genom constituit numai din ARN.

Viroizii pot fi solitari, sau pot să se asocieze în structuri compacte, de formă inelară sau bacilară, caz în care corpul lor este uşor curbat. Lungimea medie a viroizilor este de circa 50 mμ, iar lățimea acestora este estimată la aproximativ 2-2,5 mμ; greutatea lor moleculară este apreciată ca deținând valori de circa 75-125 kD.

Viroizii se propagă prin contactul direct stabilit între aceştia, respectiv organele bolnave de viroidoze, cu plantele sănătoase. Infecția cu viroizi poate fi intermediată și de variați agenți purtători, asemănător – ca mod de vehiculare, de contaminare și de infestare a plantelor – cu cel de propagare a virusurilor.

Replicarea viroizilor în celulele parazitate se realizează în nucleul celulelor gazde, ei utilizând – în acest scop – ARN-polimeraza acestor nuclei, întrucât ARN-ul viroidal poate „mima" structura ADN-ului celulei pe care au atacat-o.

Viroidozele sunt întâlnite la mai multe specii vegetale, ele provocând *clorozarea* fructelor (cum este cazul la castraveți, boala respectivă purtând

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

numele de „*cucumber pale fruit viroid*"), *nanism* şi *marmorarea clorotică* a frunzelor (boala prezentă la crizanteme şi denumită „*Chrysantheum chlorotic mootle viroid*"), *alungirea tuberculilor* (la cartof această maladie fiind denumită „*potato spindle tuber viroid*"), *dereglări* ale funcţionalităţii cloroplastelor, în clorenchimuri, sau ale *structurii biomembranelor* peretelui celular, *necroze* etc.

Viroizii sunt rezistenţi la solvenţi organici şi la lumina ultravioletă (UV), şi pot fi inactivaţi de temperaturi de 100^0C numai dacă aceştia se află în soluţie (în diluţie de 10^{-4}). Stoparea multiplicării lor este realizată la frig, la 5^0C, precum şi cu soluţii de hipoclorit, ori de actinomicină D.

1.2.1.3. Bacteriofagii

Bacteriofagii, sau *fagi*, sunt forme de virusuri care pot distruge unele bacterii fitopatogene, în corpul cărora aceştia se înmulţesc şi trăiesc ca paraziţi (*Strange*, 2003).

Bacteriofagii sunt alcătuiţi dintr-o porţiune dilatată, denumită „*cap*", de formă elicoidală sau hexagonală, în care se află localizat genomul acestora, constituit fiind din câte un unic cromozom, linear sau circular. *Capul* se continuă cu o „*coadă*", prin intermediul căruia fagul se fixează de corpul bacteriei, prin care el comunică cu celula bacteriană ce-i este gazdă, transferându-i acesteia ADN-ul său.

Fagii pot conţine ADN mono- sau bicatenar, şi numai în mod excepţional ei deţin exclusiv ARN.

Bacteriofagii pot fi utilizaţi în procedurile de bioterapie, de exemplu în cazul lui *Agrobacterium tumefaciens*, datorită capacităţii lor de a distruge bacteriile.

Tehnicile de biologie moleculară, cum sunt cele de analizare a naturii şi a numărului de catene ale acidului nucleic implicat în structurile virale, au permis decelarea infecţiilor produse de către *virusuri*, de cele de tip *viroidal* sau *micoplasmic*, metode care sunt laborioase şi costisitoare.

1.2.2. MICROORGANISMELE PROPRIU-ZISE, FITOPATOGENE ŞI FITOSIMBIONTE

În categoria *microorganismelor propriu-zise* intră *bacteriile*, *micoplasmele* şi *rickettsiile*, organisme unicelulare, cu metabolism şi genom propriu, şi cu capacitate de reproducere. Aceste tipuri de vieţuitoare, precum şi *fungii* microscopici, interacţionează cu plantele de manieră *patogenă* sau *simbiontă*. În cele ce urmează, ne vom referi la unele fenomene morfo-

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

fiziologice observate în prezența unor astfel de infecții produse în organismele vegetale, expunând sumar principalele aspecte privitoare la elementele care caracterizează aceste grupe taxonomice.

1.2.2.1. Bacteriile

1.2.2.1.1. Considerații generale

În grupul microorganismelor se încadrează în primul rând *bacteriile* sau microbii, viețuitoare extrem de răspândite – ca număr de exemplare și de specii – în toate mediile de pe pământ.

După *Prescott* și colaboratorii (1996), *bacteriile* fac parte din regnul *Monera* (*Bacteria*). Corpul lor este organizat în celule simplu structurate, primitive, ele intrând în categoria organismelor *procariote*.

Celulele procariote dețin perete celular, citoplasmă și un nucleoid (formațiune care înglobează genomul bacterian), dar nu conțin mitocondrii și plastide. Dimensiunile bacteriilor sunt cuprinse între 0,7-500 μm lungime și 0,3-1,4 μm lățime.

Morfologia bacteriilor variază în funcție de gen și de specie, corpul lor având fie formă sferică (*coc*), fie de bastonaș (*bacil*, alteori ușor curbat – *vibrion*, ori spiralat – *spiril*), fie de *filament*, atunci când acestea prezintă o formă mult alungită. Bacteriile de tip coc pot fi solitare, sau grupate câte două (*diplococi*), ori pot fi înșirate ca mărgelele (*streptococi*), sau sunt asamblate în ciorchini (*stafilococi*). Aspectul bacteriilor poate să sufere modificări în dependență de condițiile din mediul lor de viață, ele fiind răspândite în toate zonele terestre, întrucât acestea manifestă capacități adaptative remarcabile (*Zarnea*, 1983).

Bacteriile au fost primele viețiutoare care au populat Terra (cu mai bine de 3,5 miliarde de ani în urmă), timp de aproximativ 2 miliarde de ani, la acea dată ele fiind singurele forme de viață de pe pământ.

Nutriția bacteriilor este fie *heterotrofă* (*saprofită* sau *parazită*) – cea mai mare parte dintre ele procurându-și hrana, respectiv energia, din materiile organice prezente în mediul lor de viață – fie *autotrofă*, în această categorie de bacterii încadrându-se acele microorganisme care au capacitatea de a-și sintetiza, prin *chemosinteză*, substanțele organice de care celulele acestora au nevoie, folosind în acest scop energia rezultată din oxidarea unor compuși anorganici sau, mai rar, pe cale *fotosintetică* (*fotoautotrof*).

După modul lor de viață, bacteriile se disting unele de altele și prin alte două particularități fiziologice, respectiv prin faptul că există microbi *anaerobi* (primele bacterii de pe pământ – care au trăit în marele ocean planetar, primar, prezent la acea dată pe Terra – având la dispoziție o atmosferă

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

săracă în oxigen, în schimb încărcată cu variate gaze toxice), pentru care oxigenul era nociv, şi microbi *aerobi*, bacterii care au apărut pe pământ abia după ce atmosfera şi oceanul planetar s-a îmbogăţit în oxigen.

Bacteriile sunt organisme *haploide*, iar cromozomul lor este constituit din câte o unică moleculă de ADN, dispusă circular. Unele bacterii au şi ADN amplasat în citoplasmă, alcătuind formaţiuni denumite *plasmide*, care au inserate în structura lor gene ale patogenităţii bacteriene.

Bacteriile se înmulţesc numai pe cale asexuată, prin fragmentare celulară, fenomen denumit *sciziparitate*. În regim optim de viaţă, bacteriile se divid la interval de circa 12-30 de minute, fapt care explică numărul extrem de mare de exemplare microbiene existente pe pământ, dar şi rapida răspândire a lor, chiar şi a celor care au suferit o *recombinare genetică*, prin conjugare, transducţie sau prin transformare; dacă *conjugarea* semnifică transferul de secvenţe de ADN de la o bacterie la alta, *transducţia* reprezintă medierea procesului de transferare a fragmentelor de ADN, de către *bacteriofagi*. *Transformarea* genetică a bacteriilor, în mod natural poate fi provocată prin mutaţii, sau poate fi operată şi de către plasmide, formaţiuni care transferate fiind altor celule bacteriene facilitează accesibilitatea genelor în celulele gazde, mediindu-se astfel modificarea genomului bacteriei receptoare, caractere care după integrarea lor în zestrea genetică a acesteia se moştenesc şi pot fi transmise descendenţilor sau celulelor cormofitelor. Acest fenomen este valorificat în procedurile de inginerie genetică, operaţiuni practicate şi în cadrul biotehnologiei vegetale.

O altă cale de propagare a bacteriilor este prin intermediul *endosporilor*. Ei asigură supravieţuirea bacteriilor în condiţii improprii desfăşurării vieţii active a acestora. Procesul de formare al sporilor poartă denumirea de *sporogeneză* sau de *sporulare*. Sporul se formează în interiorul celulei bacteriene active, transformând-o într-o celulă specială care se înconjoară cu un înveliş protector gros, foarte rezistent la temperaturi ridicate, la uscăciune şi la acţiunea unor substanţe toxice. El încorporează şi protejează în structura sa genomul celulei bacteriene, ce se va putea exprima doar odată cu germinarea acestuia. Sporul se poate menţine, ca atare, o lungă perioadă de timp, într-o stare latentă, durată care variază în funcţie de condiţiile de mediu. În prezenţa unui regim optim de mediu, adecvat asigurării unei existenţe normale a variatelor specii bacteriene, sporul germinează şi generează o bacterie, care-şi va începe viaţa activă şi periodic se va divide.

Alcătuirea peretelui celular al bacteriilor a făcut ca microbiologii să împartă bacteriile în două mari categorii, respectiv în *Gram-pozitive* şi *Gram-negative*. Diferenţierea bacteriilor în cele două categorii se face în funcţie de reacţia de culoare a acestora, în condiţiile tratări lor cu anumiţi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

solvenți organici. Această manifestare diferențiată a variației de culoare a bacteriilor a fost relevată, încă în anul 1884, de către *Gram*, în microbiologie fenomenul purtând numele descoperitorului. Diferența de reacție a celor două categorii de bacterii rezidă în natura și structura peretelui celular. Și într-un caz și în celălalt, *peptidoglucanul* este compusul prezent în alcătuirea peretelui celular al ambelor tipuri de bacterii menționate anterior, cu diferența că la microbii *Gram-pozitivi* această substanță reprezintă aproximativ jumătate din greutatea uscată a lor, pe când în cazul bacteriilor *Gram-negative*, *peptidoglucanul* se regăsește numai în procent de 5-10%; în plus, peretele celular al bacteriilor *Gram-pozitive* este mai gros, mai omogen ca structură și conține proteine, acizi teichoici, teichuronici și polizaharide (*Zarnea*, 1983). În schimb, la bacteriile *Gram-negative* peretele celular este structurat din două membrane citoplasmatice, una dispusă la exteriorul celulei și o a doua care este situată înspre interiorul acesteia; membrana citoplasmatică externă – absentă la bacteriile *Gram-pozitive* – joacă un rol major în reglarea permeabilității în spațiul *periplasmic* al unor molecule. Membrana externă este constituită din fosfolipide, apă, proteine și lipopolizaharide. Zona periplasmică conține hidrolaze, fosfataze, amidaze, și alți compuși organici.

Există și o a treia categoie de bacterii, *micobacteriile*, care sunt acidorezistente. Peretele lor celular conține pe lângă peptidoglucan și complexe moleculare în alcătuirea cărora intră acidul micolic și ceruri, ceea ce le face rezistente la decolorare cu soluții acide, diluate, și lipsite de reacții tinctoriale la coloranții hidrosolubili (*Zarnea*, 1983).

Asupra bacteriilor, antibioticele exercită efecte bacteriostatice, prin faptul că unele afectează sinteza peretelui celular al acestora (de exemplu, penicilina și cefalosporina), sau provoacă o permeabilizare a membranei plasmatice (gramicidina), ori acționează asupra organitelor celulare, sau blochează proteosinteza (streptomicina, cloranfenicolul, ronamicina, gentamicina etc.).

Asemănător virusurilor, în unele situații și bacteriile *fitopatogene* pot preimuniza (*cross-protection*) potențialele plante gazde ale acestora, operațiune care se realizează prin infestarea țesuturilor vegetale cu tulpini sau sușe nevirulente, sau slab virulente. Acestea, odată instalate în plante, declanșează formarea în ele de reacții specifice, în raport cu genul sau specia patogenă respectivă. Astfel, s-a reușit prevenirea *cancerului* bacterian, la multe specii de pomi fructiferi, produs de – *Agrobacterium radiobacter pv. tumefaciens* – preimunizând potențialele plante gazde cu sușe avirulente, aparținătoare bacteriei respective, succese care au condus la elaborarea unor preparate de tipul *Gallirolului*, *Nogall*, *Galeinei*, precum și a altor compuși

destinați combaterii *cancerul* vegetal. Un procedeu asemănător este operant și în cazul combaterii cancerului la vița-de-vie, cu sușe avirulente de *Agrobacterium vitis*.

După *Strange* (2003), bacteriile fitopatogene pot fi categorisite în cinci grupe mari, și anume: *Corynebacterium*, *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* și *Xanthomonas*. Ele provoacă *fitobacterioze*, dintre acestea cele mai păgubitoare sunt cele care afectează productivitatea culturilor agricole și calitatea produselor vegetale recoltate sau depozitate.

1.2.2.1.2. Bacteriile fitopatogene, neoplazice

Bolile plantelor sunt provocate, în multe cazuri, de *bacteriile* fitopatogene.

Microorganismele *fitopatogene* sunt foarte variate din punct de vedere taxonomic și genetic, cum variate sunt și sursele de proveniență ale acestora, vectorii care le disemineză, și factorii ce le favorizează extinderea în corpul speciilor de cormofite.

Dintre nenumăratele bacterii fitopatogene, cele mai importante boli sunt cele provoacate de genul *Agrobacterium*, care prin intermediul ADN-ului plasmidal influențează genomul nuclear al celulelor cormofitelor gazde și provoacă alterări endocelulare care determină producerea de boli *neoplazice*. Acest tip de maladii vegetale au suscitat, într-o foarte mare măsură, interesul cercetătorilor din domeniul biotehnologiei vegetale teoretice, încă din primele decenii ale secolului XX.

Bacteriile fitopatogene – cu unele excepții, cum este cazul genului *Agrobacterium* – au servit mai puțin ca „partenere" în coculturile realizate între acestea și fitoinoculi.

În categoria bacteriilor care penetrează în plante, la nivel radicular, se află și reprezentanții genului *Agrobacterium*, un bacil mobil (care are 1-6 flageli), Gram-negativ, cu dimensiuni cuprinse între 1,5-3 μm lungime și 0,6-1 μm lățime, ce face parte din grupul *Rhizobiaceelor* nesporifere, *aerobe*. Cele mai reprezentative specii ale genului *Agrobacterium* sunt: *A. tumefaciens*, care – în urma infectării unor gazde dicotiledonate sau gimnosperme – la nivelul acestora provoacă boala *neoplasică*, *tumorală*, denumită *crown-gall* (fig. 5 și 6 *A* și B) și *A. rhizogenes*, care generează, la speciile de dicotiledonate (inclusiv la nivelul fitoinoculilor), formarea de *rădăcini firoase* (în limba engleză „hair root", fig. 6C). Ambele boli sunt de tip *oncogen* și aduc pagube însemnate în agricultură, în horticultură și în silvicultură. Fenomenele respective se manifestă și la nivelul fitoinoculilor cultivați *in vitro*, în regim de *cocultură* cu tulpini de *Agrobacterium*.

BOTANICAL UNIVERSITY LIBRARY

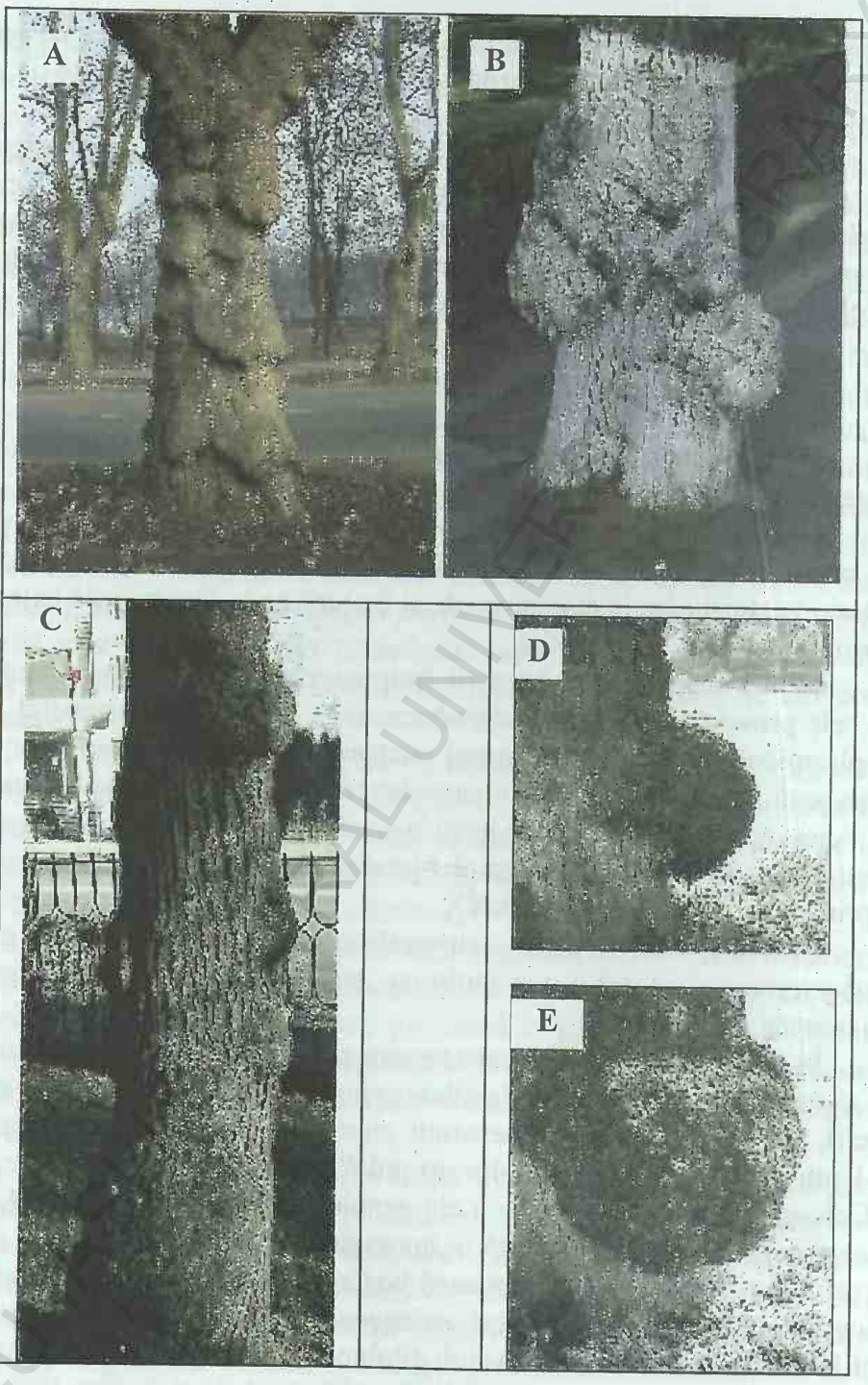


Fig. 5. Tumori multiple formate pe trunchiuri de arbori (A – la platan; B și C – la tei; D și E – la glădiță).

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

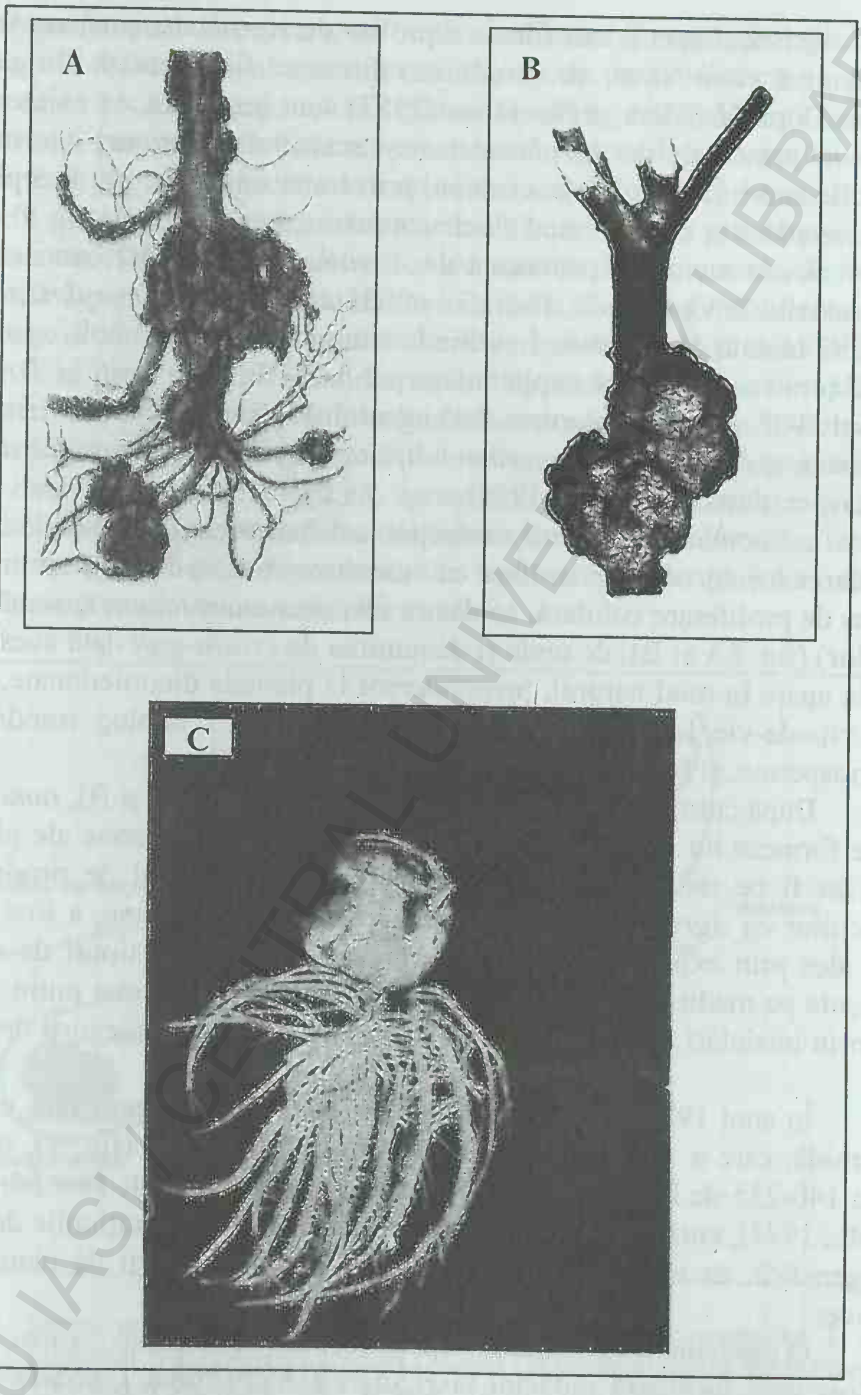


Fig. 6. Tumori tip *crown-gall* generate de infecții cu *Agrobacterium tumefaciens* (A și B) (după *Pârvu*); C – atac de rizomanie, la sfecla de zahăr, produs de *A. rizogenes*, cu formarea de rădăcini „firoase".

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Există și specii sau forme saprofite de *Agrobacterium*, nevirulente, cum sunt *A. radiobacter* și *A. rubi*, cea din urmă fiind izolată din galele de *Rubus*. După *Melchers* și *Hooykaas* (1987) sunt acceptate, ca existente, trei *biotipuri* principale de *Agrobacterium* și mai multe biotipuri intermediare; tulpinile *saprofite* de *Agrobacterium*, prin transconjugare, pot recepta plasmide *neoplazice*, în acest mod ele devenind *oncogene*.

Boala tumorală provocată de *A. tumefaciens* a fost cunoscută și a fost descrisă la vița-de-vie, încă din antichitate, de către *Theophrast*, în anii 372-287 înainte de Christos. În schimb, natura *bacteriană* a bolii „*galelor de colet*" (crown-gall) a fost explicitată și publicată de către *Smith* și *Townsend*, în anul 1907. Inițial, denumirea dată agentului infestant care provoacă maladia *crown-gall* a fost de *Bacterium*; ulterior, genul a primit numele de *Agrobacterium* (după *Gautheret*, 1959).

La locul de producere a infecției, cel mai adesea la nivelul coletului, instalarea lui *Agrobacterium* face ca în acea zonă să se declanșeze un proces intens de proliferare celulară, soldat cu formarea unor *tumori* (asemănătoare galelor) (fig. 5A și B), de unde și denumirea de *crown-gall* dată acestei boli. Boala apare în mod natural, preponderent la plantele dicotiledonate, cum ar fi la vița-de-vie, la sfecla de zahăr, la pomii fructiferi, la plop, trandafir și la gimnosperme, și foarte rar la speciile de monocotiledonate.

După cum se observă în figurile 5 (A și B) și 6 (A și B), *tumorile* pot să se formeze nu numai la nivelul coletului, ci și în alte zone ale plantelor, cum ar fi pe rădăcini, pe tulpini sau pe frunze. Modul de producere al infecțiilor cu *Agrobacterium*, la diferite categorii de organe, a fost dovedit mai ales prin experimente efectuate *in vitro*, cu variate tipuri de explante crescute pe medii de cultură de compoziții mai mult sau mai puțin complexe, prin inoculări artificiale operate la nivelul variatelor categorii de fitoinoculi.

În anul 1974 s-a dovedit faptul că, bacteria *A. tumefaciens* conține o plasmidă, care a fost codificată cu însemnul *Ti* sau *pTi* (fig. 7), ce deține între 140-235 de kilobaze perechi (*Zaenen* și colab., 1974; *Van Larebeke* și colab., 1974), entitate care a fost utilizată, ulterior, în operațiunile de inginerie genetică, ca vector de gene, folosită în scopul creării de plante transgenice.

O particularitate comună a celulelor tumorilor de tip *crown-gall*, cu a acelora care formează rădăcini fasciculate („hairy roots"), constă în faptul că, ambele tipuri de bacterii au capacități *oncogene*. În celulele gazde, ele determină producerea și excretarea unor compuși chimici descoperiți și descriși în jurul anilor '60 de către *Lioret* (1957), denumiți *opine* (tabelul 2), molecule care în mod obișnuit nu sunt sintetizate de celulele plantelor nor-

male. *Opinele* ajută bacteria să-şi individualizeze o „nişă ecologică", în raport cu alţi agenţi fitopatogeni din celule, tip de parazitism care a primit denumirea de „colonizare genetică" (*Schell* şi colab., 1979). Aceşti compuşi se constituie, pentru bacteriile care au indus formarea lor, nu numai în izvoare de energie, ci şi în surse de azot şi de carbon organic, din aceste elemente ele generând derivaţi azotaţi cu funcţii carboxilice numeroase şi cu gruparea imin-NH, de unde a derivat şi denumirea dată lor, aceea de *iminoacizi* (după *Tempé* şi *Goldmann*, 1982 şi *David* şi *Tempé*, 1985). *Iminoacizii* sunt substanţe de creştere necesare bacteriilor, celula gazdă şi metabolismul acesteia fiind aservite satisfacerii cerinţelor agentului patogen. Sintetizarea unor astfel de compuşi de către celulele *tumorale* constituie o dovadă a transformărilor suferite de genomul celulelor gazde, sub acţiunea acestor bacterii *oncogene*. Se apreciază că, aproximativ 7% din greutatea uscată a unei tumori este reprezentată de aceste *opine*. Compoziţia chimică a imunoacizilor incriminaţi este dependentă de tipul tulpinilor (suşelor) de *A. tumefaciens*, şi nu de natura celulelor gazde.

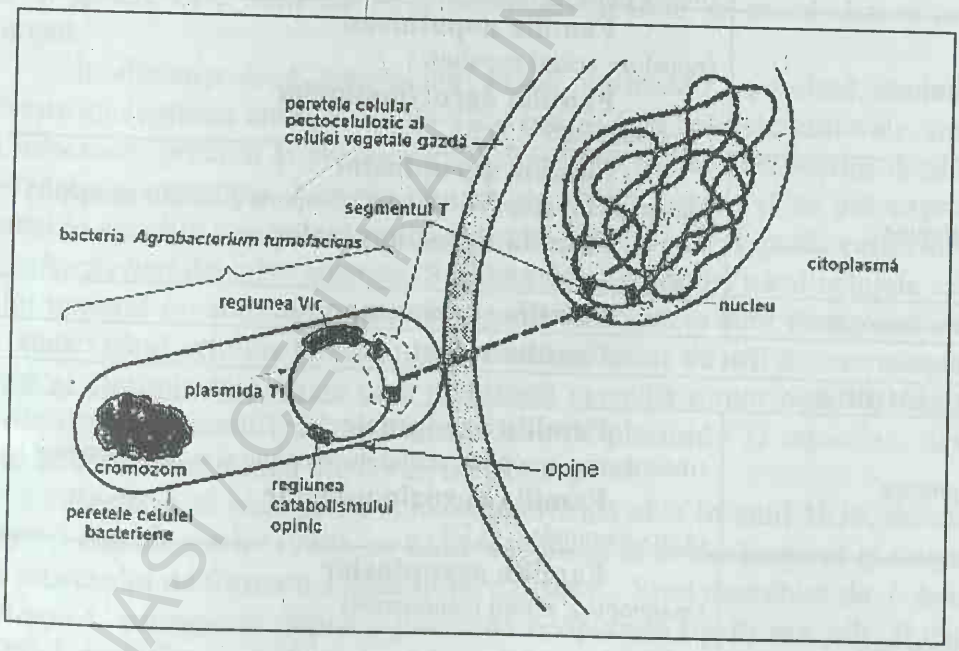


Fig. 7. Reprezentarea schematică a procesului de transfer a segmentului T al plasmidei *Ti* şi integrarea acestuia (ADN-T) în genomul celulei gazdă (după *Melchers* şi *Hooykaas*, 1987, schemă modificată de noi).

BCU IAŞI GENERAL UNIVERSITY

Kerr, încă în anul 1969, a intuit posibilitatea transmiterii fitopatogenității unei suşe virulente de bacterii, celulelor bacteriene nevirulente, sau celor ale cormofitelor, prin intermediul *plasmidelor*. În literatura de specialitate se apreciază că, există o legătură relativ apropiată între nodulii radiculari induşi la nivelul rădăcinilor de către bacteriile din genul *Rhizobium* şi bacteriile din genul *Agrobacterium*. Stabilirea unor astfel de relații apropiate a condus, fără intervenția omului, la formarea de hibrizi naturali.

Tabelul 2. Principalele tipuri de *opine* care sunt luate în considerare în clasificarea plasmidelor *Ti* de *Agrobacterium* (după *Chriqui*, 1998, modificat de noi).

Tipuri de plasmide	*Opine* identificate în țesuturile tumorale
***PLASMIDE* Ti**	
Octopine	**Familia octopinelor** (octopina, acidul octopinic, lisopina şi histopina) **Familia agropinelor** (mannopina, agropina, acidul mannopinic şi acidul agropinic)
Nopaline	**Familia nopalinelor** (nopalina, acidul nopalinic) **Familia agrocinopinelor** (agrocinopinele A şi B)
Agropine	**Familia agropinelor** (mannopina, agropina, acidul mannopinic şi acidul agropinic) **Familia agrocinopinelor** (agrocinopinele C şi D)
Succinamopine	**Familia succinamopinei**
Vitopine	**Familia vitopinei**
PLASMIDE *Ri*	
Agropine	**Familia agropinelor** (mannopina, agropina, acidul mannopinic şi acidul agropinic) **Familia agrocinopinelor** (agrocinopinele C şi D)
Mannopine	**Familia agropinelor** (mannopina, acidul mannopinic) **Familia agrocinopinelor** (agrocinopina C)
Cucumopine	cucumopina
Mikimopine	mikimopina

BU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pe această cale, linii de *Rhizobium* (*R. leguminosarum*, *R. trifolii* şi *R. phaseoli*) au devenit capabile să inducă formarea de *tumori* de *crown-gall*, sau geneza de *rădăcini firoase* („*hairy root*"), după ce acestea au receptat în genomul lor, plasmida *Ti* sau *Ri* (*Hooykaas* şi *Schilperoort*, 1984). În contrapartidă, s-a observat transfer de plasmide *sym* (responsabile de formarea nodozităţilor azotofixatoare, pe rădăcini), de la *Rhizobium* la tulpinile de *Agrobacterium*, dar niciodată în literatura de specialitate nu s-a semnalat fixarea azotului atmosferic de către astfel de nodozităţi (*Hooykaas* şi colab., 1982, 1984).

În cazul plasmide *Ti*, *tumorogeneza* este provocată de un anumit segment al acesteia, notat cu ADN-T (fig. 7). Pe lângă efectul *oncogen* al segmentului ADN-T al plasmidei, el poartă şi genele care inserate celulelor în care ele penetrează le transmit acestora capacitatea de a sintetiza *iminoacizi*, derivaţi ai argininei, respectiv *octopină* şi *nopalină*, compuşi altfel nesintetizaţi în celulele gazde, normale. În consecinţă, plasmida *octopină* deţine un segment ADN-T care conţine gena responsabilă de sinteza *octopinei*, dar şi genele care sintetizează substanţele capabile să metabolizeze acest compus.

În alte suşe de *A. tumefaciens* există plasmida *Ti nopalină*, în care se găseşte un segment oncogen ADN-T ce codifică, în celulele tumorale, sinteza *nopalinei*, precum şi genele care dirijează formarea compuşilor destinaţi metabolizării acesteia. Genele menţionate se pot insera şi se pot exprima numai în speciile vegetale care le sunt caracteristice ca şi gazde celulelor de *Agrobacterium* descrise anterior. S-a constatat că, atunci când celulele calusului tumoral prezintă o creştere neorganizată, *opinele* sunt de tip *octopine*, iar atunci când celulele tumorale generează un calus cu arii în care sunt prezente şi cloroplastele (zone care manifestă capacitate morfogenă), celulele gazde deţinând modificări genetice induse de plasmida *Ti nopalină*, devin apte de a sintetiza numai *nopalină*, nu şi *octopină*.

Bacteria *A. rhizogenes* a fost identificată abia în anul 1930, de către *Riker* şi colaboratorii (1930), ca fiind responsabilă de declanşarea şi susţinerea procesului de formare a rădăcinilor „firoase". Spre deosebire de *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes* deţine o plasmidă neoplazică tip *Ri* sau *pRi*, al cărui ADN-T specific – odată penetrat în celulele plantelor gazde – declanşează modificarea caracterelor acestora şi determină, prin intermediul a trei gene existente în ADN-T-ul plasmidei *Ri* (notate cu rolA, rolB şi rolC), o intensificare a sintezei de AIA (acid β-indolilacetic), provocând, drept consecinţă, o stimulare a *rizogenezei*. În cazul infecţiei cu *A. rhizogenes*, *opinele* sintetizate sunt diferite de acelea caracteristice celulelor infectate cu bacteria *A. tumefaciens*. Astfel, în celulele atacate de *A. rhizogenes* se sintetizează

agropină, *mannopină*, *cucumopină* și *mikimopină* (vezi tabelul 2) (după *Tepfer* și *Tempé*, 1981).

În general, transformările cauzate în celulele cormofitelor de către plasmida *Ti* au fost mult mai intens studiate decât cele provocate de plasmida *Ri*, plasmida *Ti* suscitând interesul geneticienilor pentru calitatea sa de *sistem vectorial natural*, operațional și în experimentele de inginerie genetică. Acesta, în urma procesului de infecție, generează o copie a ADN-T-ului plasmidial, care se integrează stabil în genomul celulelor gazde, declanșând boala *tumorală*. Procedura s-a constituit într-un instrument model de *transferare* și de *integrare* a unor gene străine în genomul cormofitelor, cu predilecție la speciile dicotiledonate, și mai rar la cele monocotiledonate.

Studiile de biologie moleculară au relevat faptul că, în procesul de infectare a celulelor cormofitelor – gazde ale unor atacuri cu *Agrobacterium* – există mai multe etape principale care privesc: *recunoașterea* gazdei de către celula bacteriană și *atașarea* bacteriei de celula vegetală, la nivelul unei leziuni, *transferarea* ADN-ului, respectiv a informației genetice provenită dintr-un organism procariot unei celule eucariote și *integrarea* acestei informații în genomul celulei cormofite; în continuare va urma, sau nu, *exprimarea* genelor purtate de plasmidă (după integrarea acestora în genomul gazdei), fenomen manifest în momentul apariției la nivelul organelor plantei gazdă a simptomelor specifice, caracteristice bolii. Prin variate proceduri experimentale se încearcă facilitarea parcurgerii cu succes a acestor trepte și realizarea regenerării la nivelul fitoinoculilor de plantule, în urma depășirii fazei de integrare a genelor bacteriene în genomul celulelor gazde pe care le-a transformat genetic.

În contrapartidă, celulele vegetale rănite elaborează compuși *fenolici*, de tipul *acetosiringonei* sau a *hidroxiacetosiringonei* (după *Stachet* și colab., 1985), substanțe care într-o primă fază exercită un efect *chimiotactic*. Acești compuși acționează asupra celulelor de *Agrobacterium* ca molecule-semnal. În plasmida de *Agrobacterium* se află inserate și gene numite „*vir*", care mijlocesc atașarea bacteriei de celula gazdă, fenolii elaborați în zona rănită, de către celulele atacate, inducând exprimarea genelor *vir*. În procesul de atașare, bacteria secretă *glucani* (beta-1,2-glucan și succinoglucan), compuși glucidici care exercită un rol important în legarea bacteriei de celulele vegetale. Descoperirea rolului jucat de compușii fenolici, la locul de rănire, a servit și servește în experimentele de inginerie genetică, efectuate în regim de *cocultură* a cormofitelor cu celulele de *Agrobacterium*. De exemplu, prin adăugarea de *siringonă*, în culturile de țesuturi vegetale inoculate cu diverși vectori de *A. tumefaciens*, s-a facilitat mărirea randamentului în ameliorarea operațiunilor de integrare și de transfer, respectiv

a eficientizării metodelor în care au fost utilizați vectori plasmidiali, în medierea transformărilor genetice demarate la nivelul diferitelor specii de plante, practicate ca proceduri de biotehnologie vegetală, în care se urmărește modificarea genomului fitoinoculilor de natură variată.

Atât în constituția plasmidei *Ti*, cât și a celei *Ri*, există – în mare – două părți distincte, și anume: una dintre părți este *transferabilă* – ADN-T – ce se va integra și se va exprima numai în celula plantei invadate, pe care bacteria o recunoaște ca fiind o potențială gazdă adecvată, fapt care se petrece abia după trecerea plasmidei în celula cormofitică; o altă parte a plasmidei, mult mai mare, poartă denumirea de regiune (zonă sau parte) *netransferabilă*, ce deține gene care se exprimă numai în celula bacteriană. La ambele tipuri de plasmide *Ti* și *Ri*, în porțiunea netransferabilă a acestora sunt cartate următoarele grupări de gene: o regiune a genelor responsabile de *virulența* plasmidei (regiunea *vir*), o alta care face posibil *transferul* conjugativ (regiunea *tra*), o regiune care asigură *replicarea* plasmidei în celula bacteriană (regiunea *ori*) și o zonă care *conține genele* ce servesc catabolismului *opinelor* (regiunea *opc*). În cadrul acestor grupări, între plasmida *Ti* și *Ri* există puține tipuri de gene comune. Totuși, genele conținute în regiunea transferabilă (regiunea *T*) dețin – la ambele tipuri de plasmide – *oncogenele*, care sunt direct răspunzătoare de manifestările neoplazice ale lui *Agrobacterium*, fie ele *tumorale*, fie *rizogene*. Din experimentele de hibridări moleculare a rezultat faptul că, regiunea *vir*, a ambelor tipuri de plasmide (*Ti* și *Ri*), este în mare măsură omoloagă. Schematic, în figura 7 este reprezentată inserarea regiunii *T* a plasmidei pe nucleul celulei gazdă. Plasmida, odată încorporată în celula gazdă, pentru o perioadă de timp poate să reziste dezintegrării ei enzimatice, de către endonucleazele de digestie. *Oncogenele* („*onc*"), cuprinse în segmentul ADN-T, codifică sinteza de trans-zeatină (*Akiyoshi* și colab., 1985; *Beaty* și colab., 1986) și au un locus responsabil de producerea AIA (*Liu* și *Kado*, 1979; *Liu* și colab., 1982), ceea ce explică nivelul înalt de fitohormoni care susțin intensul proces proliferativ manifest în *neoplasm*, concretizat prin tumorogeneză sau rizogeneză amplă și haotică, precum și *independența hormonală* a unor astfel de țesuturi *canceroase*. De o parte și de alta a regiunii de transfer se găsesc secvențele *border L* și *R*, ce mărginesc segmentul de plasmidă *Ti*, în care ele se interpun în locul segmentului ADN-T, cu proprietăți oncogene, alcătuind vectorii recombinați, genele transferabile și genele marker dorite. Atât timp cât porțiunea de ADN-T – cu proprietăți *neoplazice* – este prezentă din țesutul tumoral, din acesta nu pot fi regenerate plante normale. Plasmidele *Ti*, destructurate, poartă numele de plasmide „dezarmate".

1.2.2.1.3. Bacteriile azotofixatoare sau simbioza diazotrofă

Numeroase specii de procariote au capacitatea de a fixa azotul atmosferic (N_2), transformându-l în amoniu sau în nitrat. În această categorie intră bacteriile *azotofixatoare*, supranumite și *diazotrofe*, cu principali reprezentanți genurile *Rhizobium* și *Bradyrhizobium*.

Azotul este un element chimic indispensabil plantelor. Agricultura modernă, pentru sporirea productivității plantelor de cultură, utilizează cantități mari de îngrășăminte azotate. Dar, tehnologia de producere industrială a unor astfel de compuși presupune costuri energetice ridicate, iar, pe de altă parte, excedentul de nitrați în sol și, ulterior în plante, în timp cauzează producerea – atât la om, cât și la animalele erbivore – apariția unor boli, cum ar fi *methemoglobinemia*, întrucât în corpul organismelor carnivore, în ficat, nitrații acumulați din hrană sunt reduși la nitriți, iar nitriții se combină cu hemoglobina făcând-o inaptă de a mai fixa oxigenul. Nitriții, pe alte căi metabolice, pot fi convertiți în *nitrosamine*, care acumulându-se în ficat au un foarte ridicat potențial *oncogen* (*Preininger* și *Gyurján*, 2001).

Acțiunea benefică a bacteriilor azotofixatoare este cu atât mai importantă, cu cât prin activitatea lor biologică, pe cale naturală, acestea duc la acumularea de azotați în sol, în timp ce utilizarea în practică a îngrășămintelor azotate, de sinteză, conduce la o creștere exagerată a concentrației de azotiți în terenurile agricole, producând implicit o poluare a acestora.

Simbioza diazotrofă este un proces fiziologic caracteristic plantelor leguminoase, respectiv speciilor din familia *Fabaceae*.

La *leguminoase*, bacteriile azotofixatoare pătrund în rădăcini prin perișorii absorbanți (fig. 8A). Din aceștia, ele migrează în parenchimul cortical al rădăcinilor și colonizează țesuturile externe ale scoarței tinerelor radicele, provocând – la locul lor de fixare – formarea de *tumorete* numite *nodozități* (fig. 8B).

Bacteriile *azotofixatoare*, într-o primă fază de realizare a legăturii lor cu rădăcinile, sunt atrase de *lectine*, compuși secretați în sol de sistemul radicular al plantelor care le sunt gazde specifice (*Zamfirache* și *Toma*, 2000). *Lectinele* servesc la recunoașterea de către bacteriile simbionte a speciei vegetale față de care acestea prezintă afinitate. Fixarea bacteriilor pe suprafața rizodermei se poduce prin intermediul unei proteine. Prin mijlocirea enzimelor, de tipul celulazei, a pectinazei și a hemicelulazei, bacteriile azotofixatoare înlătură, prin hidroliză, pereții pectocelulozici ai celulelor radiculare, ele penetrând astfel în interiorul celulelor țesuturilor superficiale ale rădăcinilor tinere. *Bacteriile azotofixatoare*, respectiv *diazotrofe*, ajunse la nivelul plasmalemei traversează această biomembrană prin pinocitoză și

se instalează în citoplasma celulelor vegetale gazde. După penetrarea lor în citoplasmă, acestea sunt înconjurate de o membrană elaborată de reticulul endoplasmatic şi de complexul *Golgi* al celulei vegetale, rezultând astfel formaţiunile numite *bacteroizi*, care pot îngloba în ele până la 20 de exemplare de bacterii.

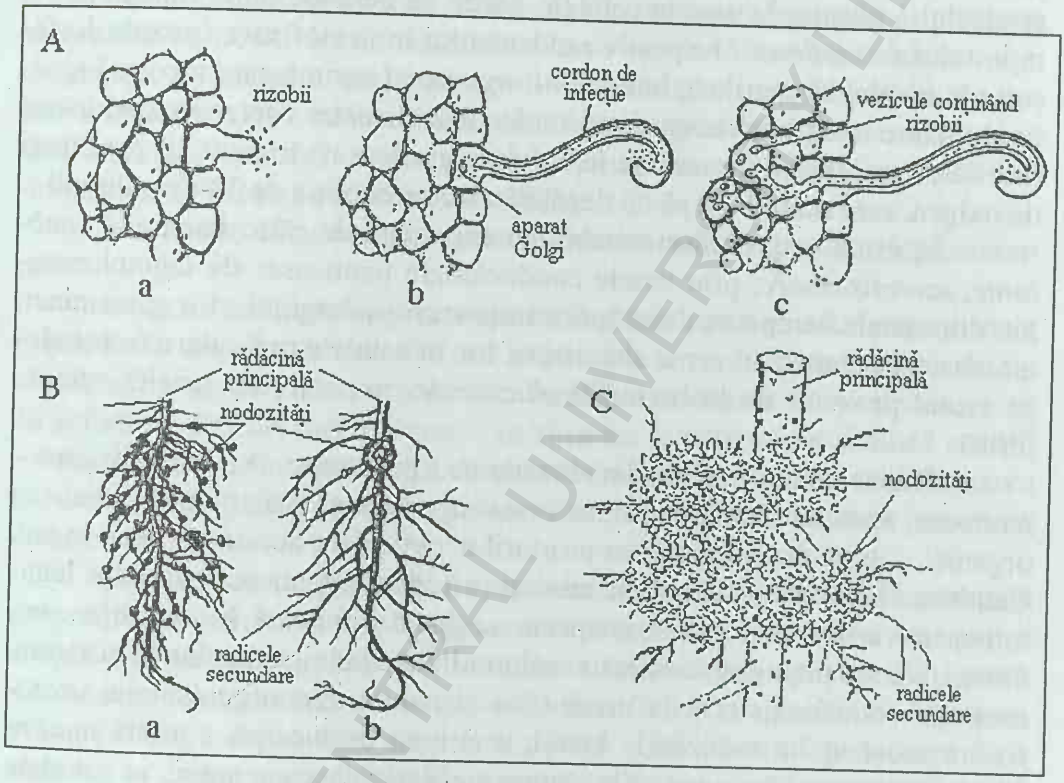


Fig. 8. Reprezentarea schematică a modului de producere a infecţiei cu bacterii *azotofixatoare* la nivelul perişorilor absorbanţi ai rădăcinilor, cu formarea de nodozităţi [A – stadii succesive ale procesului de infectare a perişorilor absorbanţi (a, b, şi c) cu celule de *Rhizobium* (după *Zamfirache* şi *Toma*, 2000); B – rădăcini cu nodozităţi (după *Ciobanu*, 1971; a – rădăcini de mazăre; b – rădăcini de lupin); C – *grupuri* de *nodozităţi actinorizale* de *Frankia sp.* la *Casuarina sumatrana* (după *Zamfirache* şi *Toma*, 2000)].

Cu ocazia instalării bacteriilor *azotofixatoare* în celulele ţesuturilor radiculare, la nivelul acestora ia naştere o *tumoretă*. La leguminoase, aproximativ 80% din totalul celulelor situate în zona piliferă a rădăcinilor sunt colonizate cu bacterii *azotofixatoare*. Celulele plantelor infectate cu astfel de bacterii sintetizează un pigment vegetal, care din punct de vedere chimic se încadrează în categoria hemoglobinelor, numit *leghemoglobină*. Acest compus reprezintă aproximativ 30% din totalul proteinelor solubile ale celulelor

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

gazde, *biopigment* ce rezultă în urma raporturilor de *simbioză* care se stabilesc între celulele radiculare și bacteriile *diazotrofe*, respectiv *azotofixatoare*. Acest biopigment este o proteină complexă, care exercită un rol de substanță tampon ce poate absorbi și poate ceda celulelor – în funcție de cerințele lor – oxigenul indispensabil producerii respirației oxidative. De sinteza și nivelul *leghemoglobinei* în celulele gazde va depinde buna funcționare a raportului de *simbioză*, respectiv randamentul în azotofixare (proces desfășurat la nivelul bacteriilor), întrucât *nitrogenaza* (enzimă care mediază reacția de fixare a azotului atmosferic, molecular, de către bacteriile *simbionte*) este foarte sensibilă la prezența în celulele gazde a unor cantități prea mari de oxigen, care nu trebuie să nu depășească concentrația de 30 de milimoli.

În urma activităților metabolice exercitate de către bacteriile *simbionte*, *azotofixatoare*, prin vasele conducătoare lemnoase, ale leguminoaselor din zonele temperate, are loc transportul asparaginei și a glutaminei, aminoacizi rezultați în urma sintetizării lor în celulele radiculare folosindu-se azotul provenit de la bacteriile *diazotrofe*, respectiv de origine atmosferică.

După moartea plantelor *simbionte*, posesoare de bacterii *azotofixatoare*, azotul atmosferic – transformat în compuși azotați, anorganici sau organici – după descompunerea țesuturilor radiculare acesta va trece în sol. Cantitatea de azotați din sol, acumulați prin descompunerea plantelor leguminoase, variază în funcție de specia vegetală implicată în *asociația simbiontă*, vârsta plantelor, respectiv volumul sistemului radicular al acestora, masa de noduli existentă la nivelul lor și natura micoorganismului *azotofixator* existent în nodozități. Astfel, o cultură de lucernă – aflată în *simbioză* cu bacteria *diazotrofă Rhizobium meliloti* – face ca, anual, în sol să se acumuleze, per hectar, aproximativ 300 kg de N_2, iar un hectar de mazăre simbiontă cu *R. leguminosanum* cedează terenului în care ea a trăit, circa 52 kg de azotați, originali din azotul atmosferic (*Zamfirache* și *Toma*, 2000).

O importantă și modernă ramură a cercetărilor de biotehnologie vegetală o constituie aceea care se preocupă de realizarea unui sistem artificial de *simbioză* între diferite microorganisme *diazotrofe* și celulele, respectiv țesuturile rădăcinilor cormofitelor, altele decât leguminoasele.

Bacteriile *azotofixatoare* (*diazotrofe*) trăiesc, de regulă, libere în sol și în apă. În marea lor majoritate, acestea sunt *anaerobe*, oxigenul inactivând nitrogeneza din celulele lor. Bacteriile *diazotrofe*, *anaerobe*, pot fi de două tipuri: nefotosintetizante sau fotosintetizante. În natură, microorganismele *diazotrofe anaerobe*, sunt cele mai eficiente în ceea ce privește randamentul metabolismului lor în fixarea azotului atmosferic. În această categorie se încadrează *cianobacteriile* lipsite de heterocişti (vezicule). Dintre spe-

ciile de bacterii strict *anaerobe* menționăm: *Bacillus polymyxa*, *B.macerans* și *Clostridium pasteurianum* (primul diazotrof descoperit și analizat); tot în această grupare intră și unele *hidrogenbacterii*, *enterobacterii*, *rodobacteriile* fotosintetizante, microaerofilele (cum este *Rodospirillum rubrun*) și bacteriile *sulfooxidante*, de exemplu *Thiobacillus ferrooxidans*.

Microorganismul *azotofixator* cel mai comun, și tolerant la prezența oxigenului în mediul lui de viață, este *Azotobacter*. Dintre bacteriile *aerobe*, *diazotrofe*, menționăm, pe lângă genul *Azotobacter* (care fixează N_2 nu numai în cursul nopții, atunci când eliberarea oxigenului lipsește, absentând fotosinteza), și genul *Gloeotheca*, care cuprinde bacterii *azotofixatoare* fotosintetizante (*Preininger* și *Gyurján*, 2001).

Bacteriile *diazotrofe*, din genul *Rhizobium*, sunt specifice leguminoaselor.

În cazul exemplelor prezentate, atât plantele, cât și microorganismele implicate în asociațiile descrise pot să ducă și o viață independentă, de tip *diazotrof asimbiont*; dar, în momentul realizării unei asocieri *simbionte*, gazda suferă modificări morfologice – ca răspuns la parteneriatul odată stabilit – manifestate și prin producerea de schimbări anatomice, cum sunt formarea de *noduli*, iar din partea microorganismului – în relație cu planta – generarea de *heterocişti*.

Dintre microorganismele fixatoare de azot, *tolerante* la prezența oxigenului în mediul lor de viață, *aerobe* sau *facultativ aerobe*, sau pur și simplu *indiferente* la ambientul oxigenat, menționăm speciile din genul *Azotobacter*. Aceste bacterii le găsim în rizosfera unor plante catalogate ca având pe lângă capacitatea de a fixa azotul atmosferic și aptitudinea de a elabora, în *rizocenoză*, substanțe care să exercite o acțiune *stimulatoare asupra creșterii cormofitelor*. Un exemplu în această direcție îl constituie combinația realizată între *Paspalum notatum* și *Azotobacter paspali* (*Dőbereiner* și colab., 1972).

O altă categorie de *simbioză azotofixatoare*, diferită de aceea caracteristică leguminoaselor, este cea întâlnită la plantele *neleguminoase*, infectate cu *actinomicete* (microorganisme unicelulare, care din punct de vedere filogenetic fac trecerea de la bacterii la ciuperci; corpul lor, în formă de hife – ramificate sau nu – mai fine decât cele ale fungilor, are o organizare celulară de tip procariot, specifică bacteriilor), asociație care alcătuiește ceea ce poartă denumirea de *actinorize*. În această categorie de simbioză intră actinomiceta *Frankia* (fig. 8C și 9), care este simbiontă cu rădăcinile a peste 200 de specii de plante neleguminoase, cum este și arinul negru (*Zamfirache* și *Toma*, 2000). *Preininger* și *Gyurján* (2001) apreciau că, prin căderea și

descompunerea frunzelor de arin negru, în sol se acumulează aproximativ 100 kg de azot/ha/an.

Gramineele pot și ele să dezvolte asociații *diazotrofe*, dar instabile, bacteriile fiind localizate în jurul rădăcinilor, mai ales a perișorilor absorbanți ai acestora, ori în spațiile intercelulare ale țesuturilor radiculare (*Preininger* și *Gyurján*, 2001). Tot o biocenoză *azotofixatoare* de tip radicular se poate întâlni și la unele cereale de cultură (de exemplu la porumb), la acestea existând o asociație stabilă produsă între bacteriile *Azospirillum lipoferum* și *A.brasilense.* Astfel de asociații există și în cazul speciilor vegetale răspândite în zonele temperate.

În afara *simbiozelor diazotrofe*, radiculare, sunt cunoscute și bacterii *azotofixatoare* care sunt întâlnite pe *tulpini* sau pe *frunze*. Astfel, *cianobacteria Gunnera* a fost identificată ca realizând relații *simbionte azotofixatoare*, chiar și la nivelul apexurilor caulinare (*Johansson* și *Bergman*, 1992).

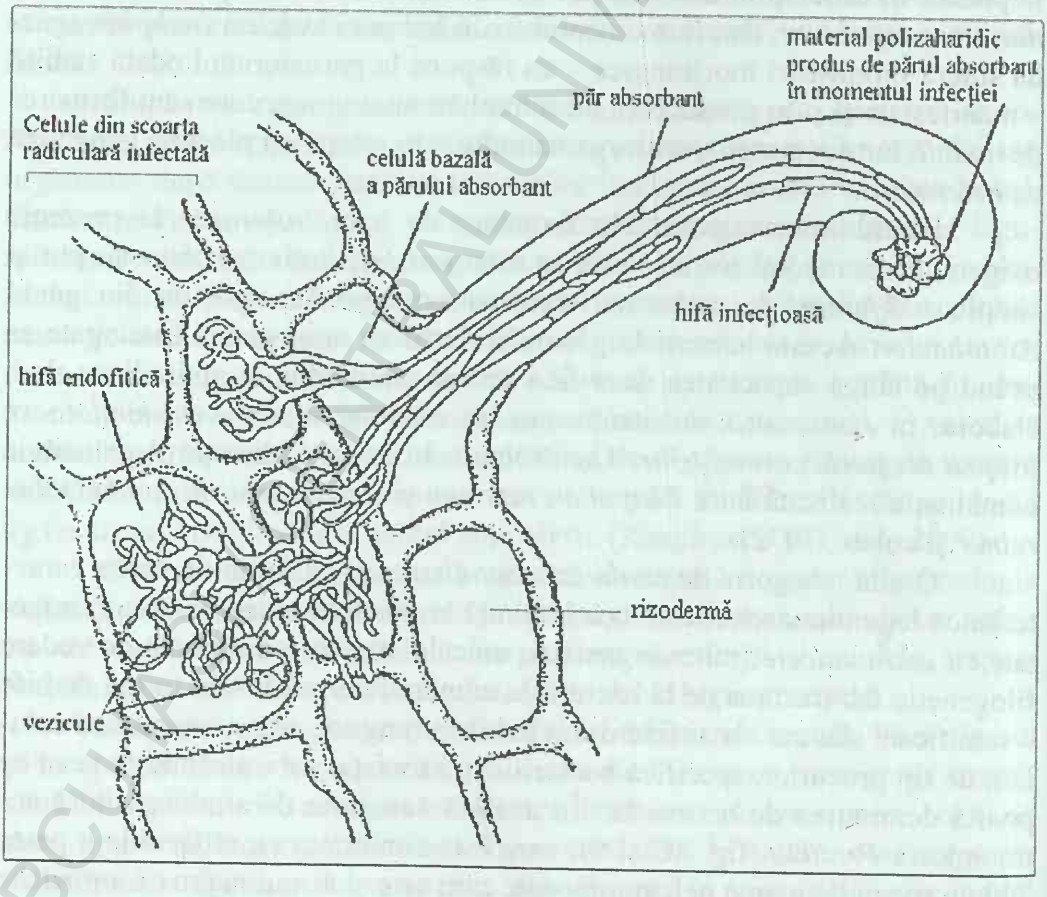


Fig. 9. Reprezentarea schematică a actinorizei simbionte azotofixatoare, produsă de *Frankia* sp. (*Dommergues* și colab., 1985, după *Zamfirache* și *Toma*, 2000).

Alte bacterii *diazotrofe*, sunt fie ataşate de suprafaţa tulpinilor şi a frunzelor, fie sunt localizate în spaţiile intercelulare ale acestora. Dintre acestea, menţionăm bacteriile aparţinătoare genului *Acetobacter* (*simbiont* cu plantele de trestie de zahăr, de *Pennisetum* sau de *Ipomaea batata*), *Azoarcus* (*simbiont* cu plantele de *Sarracenia*), *Azotobacter* (simbiont cu *Sarracenia* sau cu *Vanda*), *Herbaspirillum* (*simbiont* cu trestia de zahăr şi cu *sorgul*), şi altele (*Preininger* şi *Gyurján*, 2001).

O *asociaţie simbiontă diazotrofă* este realizată şi de bacteria filamentoasă *Anbaena*, împreună cu frunzele ferigii de apă *Azolla*. Bacteria se instalează în zona bazală a frunzelor, fără ca la nivelul acestora să se distingă producerea unor modificări morfologice vizibile. Ferigile aparţinătoare genului *Azolla* sunt plante foarte răspândită în orezăriile din zonele tropicale şi subtropicale. După moartea acestor plante, rădăcinile lor, prin descompunere, se constituie într-un îngrăşământ azotat natural, ecosistemul îmbogăţindu-se cu aproximativ 600 kg de azot/ha/an (*Preininger* şi *Gyurján*, 2001).

Cercetări de genetică moleculară au permis stabilirea faptului că, la unele microorganisme a fost descrisă prezenţa a 15 gene responsabile de fixarea azotului atmosferic, numite gene *nif* („nitrogen fixation").

După *Preininger* şi *Gyurján* (2001) se consideră că, din anul 1970 studiile axate pe problematica fixării azotului atmosferic de către microorganisme s-au orientat – în principal – înspre realizarea a patru obiective majore, şi anume:

- *transformarea* şi *transferarea* genelor *nif* în genomul altor bacterii, nu în cel al plantelor;
- *sporirea eficienţei* în simbiozele *azotofixatoare* existente;
- *extinderea specificităţii* plantelor actualmente restrânse, în raport cu *rizobia* preferată (rizobia fiind entitatea simbiontă constituită între bacteriile din sol şi plantele din familia leguminoase, respectiv *Fabaceae*);
- stabilirea de *noi asociaţii artificiale* cu capacităţi *azotofixatoare*.

Dixon şi *Fuler* (1976) au realizat *in vivo* o plasmidă (pRD1), care conţinea gene *nif*. Faptul a permis utilizarea plasmidei respective pentru vehicularea acestor gene în genomul altor tulpini bacteriene. Operonul *nif* determină sinteza *nitrogenazei*. El prezintă o aceeaşi structură atât la bacteriile *azotofixatoare* libere, cât şi la cele *simbionte*, determinismul genetic al ansamblului factorial care se stabileşte între bacteriile *simbionte* şi celulele gazde este complex şi încă insuficient cunoscut. De exemplu, pe lângă operonul *nif* al lui *Rhizobium*, există şi alţi factori genetici determinanţi, responsabili de buna desfăşurare a reacţiilor de asociere dintre bacterie şi celula vegetală. Astfel, genele *nod* sunt răspunzătoare de formarea nodozi-

tăților (tumoretelor) pe rădăcinile de leguminoase, iar constituirea unităților bacteroide, fixatoare de azot, este mediată de genele *fix*, ansamblul de gene bacteriene implicate în această simbioză fiind notat cu *sym*. În acest caz, problema principală care stă în fața ingineriei genetice privește realizarea de plasmide hibride, prin intermediul cărora să se obțină gene *nif*. Întrucât plasmida pRD1 are o greutate moleculară foarte mare, nu a fost posibilă utilizarea directă a ei în transformarea altor bacterii, cu ADN plasmidial. În acest context, s-a pus problema clonării genelor *nif* pe plasmide mai mici. Ulterior, s-a realizat o plasmidă hibridă codificată pWK 120, care într-o celulă gazdă de *E.coli* a manifestat activitate nitrogenazică, dar nu a fost prezentă azotofixarea. Cu alte cuvinte, cu aceste experimente s-a deschis calea efectuării de noi cercetări, mai profunde, în direcția obținerii de capacități *azotofixatoare* la organisme modificate genetic, prin intermediul genelor *nif*.

Alte cercetări au fost orientate înspre valorificarea practică a capacităților *azotofixatoare* naturale ale unor viețuitoare, prin crearea de noi sisteme artificiale de *diazotrofie*, între bacterii și variatele specii de cormofite. Acest deziderat privește efectuarea unor studii menite să soluționeze problemele stringente care se referă nu numai la introducerea unor bacterii *diazotrofe* în rădăcinile plantelor, ci după obținerea acestei infiltrări să se asigure funcționarea sistemului asociativ realizat, cu menținerea în timp a stabilității acestuia.

1.2.2.2. Micoplasmele

Micoplasmele sunt microorganisme procariote, unicelulare, cele mai mici dintre acestea având un diametru cuprins între 250-800 mμ. Ele sunt filtrabile, lipsite de perete celular (gimnoplaste), caracteristică care le conferă un polimorfism accentuat (*pleomorfie*), construcție care le permite o permanentă remodelare a corpului lor, cel mai adesea ele având o formă ovoidală sau sferică. Ca și virusurile, micoplasmele se transmit prin vectori. Ele sunt capabile atât de viață parazitară, cât și de o existență independentă, și pot fi cultivate și pe medii artificiale (*Strange*, 2003).

Genomul micoplasmelor este alcătuit atât din ADN, cât și din ARN.

Bolile produse de *micoplasme* sunt denumite *micoplasmoze*. Ele sunt întâlnite nu numai la plante și la animale, ci și la om (*Pamfil*, 1999). La plante, sunt descrise circa 80 de maladii provocate de micoplasme, atât la speciile ierboase, cât și la cele lemnoase.

Fitomicoplasmozele sunt boli care intră în categoria maladiilor sistemice, care provoacă, uneori, alterări ale echilibrului balanței fitohormonale,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sterilitate, precum şi o dezechilibrare a raporturilor dintre mugurele terminal, în cadrul dominanţei apicale, şi mugurii axilari (*Strange*, 2003).

În corpul plantelor, fitoplasmele sau micoplasmele se localizează în floem, sursa lor de hrană fiind produşii de fotosinteză prezenţi în seva elaborată, pe traiectul vaselor liberiene generând necroze (*Strange*, 2003).

Dat fiind faptul că, micoplasmele sunt celule nude, ca şi protoplaştii vegetali, acestea sunt sensibile la stresul osmotic. În plus, micoplasmele sunt distruse de antibiotice de tipul cloramfenicolului, a aureomicinei şi a tetraciclinei, dar sunt rezistente la penicilină şi la streptomicină.

După producerea infecţiei cu micoplasme, durata de incubare a bolii este de circa 30-40 de zile. Propagarea micoplasmelor se face prin intermediul plasmodesmelor, chiar şi în cazul tuburilor ciuruite.

Fitomicoplasmozele produc *hiper-* şi *hipoplazii*, uneori *metaplazie* şi *filoidie* (de exemplu, determină generarea de frunze la nivelul inflorescenţelor), ori *cloroze*, iar la ceapă, *aspermie*. Boala se propagă cu precădere prin artropode, în care micoplasmele pot prolifera (*Strange*, 2003).

1.2.2.3. Rickettsiile

Rickettsiile sunt o categorie aparte de bacterii, obligat parazite, amplasate endocelular, ce nu pot fi cultivate pe medii artificiale.

După tipul de organizare celulară, de dimensiune, formă, metabolism, mod de diviziune şi sensibilitate la antibiotice, *rickettsiile* manifestă caracteristici apropiate de cele ale celulelor bacteriene. Ele produc boli la om şi animale. În organismele vegetale, rickettsiile au fost descrise ca fiind prezente şi în canalele laticifere, de exemplu la plantele de papaia (*Strange*, 2003).

1.2.2.4. Fungii microscopici

Ciupercile fac parte din regnul *Fungi*. Ele sunt organisme *eucariote*, *heterotrofe*, microscopice sau macroscopice, cu precădere pluricelulare, mai rar unicelulare, ce sunt lipsite de pigmenţi asimilatori. Corpul ciupercilor (*talul*) este alcătuit din *hife* şi poartă numele de *miceliu*.

În regnul *Fungi* există o foarte mare varietate de specii, care au în comun modul lor de viaţă *saprofit* (cele mai multe), *simbiont* sau *parazit*, cele din urmă constituindu-se în agenţi patogeni care provoacă boli denumite *micoze* (*mykes* = ciupercă), prezente la plante şi la animale, şi într-o mai mică măsură şi la om (*Pârvu*, 1996).

BCU "IOAN SLAVICI" TIMIŞOARA UNIVERSITY LIBRARY

Organismele fungice posedă *pereți celulari* cu structuri și compoziții chimice variate. Ei dețin, pe lângă celuloză, *glucan* și *chitină*, aceasta din urmă fiind un compus care intră și în structura corpului insectelor. *Citoplasma* celulelor fungice conține unul sau mai mulți *nuclei* individualizați (celulele de acest tip fiind denumite *sinciții*) și este lipsită de plastidom.

Taxonomia ciupercilor este complexă (*Pârvu*, 2003). Ea reunește, într-un conglomerat eterogen, mai multe tipuri de organisme, care prezintă variate particularități morfologice, structurale și metabolice, pe baza unor criterii caracteristice comune, specifice.

Variatele specii de ciuperci au nu numai aspect diferit (ca mărime și formă), și particularități în ceea ce privește desfășurarea ciclului lor de viață, dar și ca mod de înmulțire, reproducerea fungilor fiind asexuată sau/și sexuată.

Înmulțirea *asexuată* a ciupercilor se realizează fie prin fragmentarea talului, fie prin *spori* asexuați, în timp ce reproducerea *sexuată* are loc prin *gametogamie*, *gametangiogamie* sau prin *somatogamie*, în urma acestor ultime procese rezultând *sporii sexuați* (*Pârvu*, 1996, 2003; *Pamfil*, 1999).

Fungii, în mare, pot fi subîmpărți în *micro-* sau *macromicete*, în categoria micromicetelor încadrându-se ciupercile microscopice care, la rândul lor, pot fi *gimnoplaste* (lipsite de perete celular), cu corp de tip *plasmodiu* (de exemplu *Mixomicetele*) și *ciupercile inferioare* (*Myxomicota*). Tot din categoria fungilor microscopici, unicelulari, fac parte și *drojdiile* sau *levurile*, care aparțin încrengăturii *Eumycota*, ciuperci mai evoluate, cu celule care au perete celular, citoplasmă și nucleu (unul, doi sau mai mulți). Tot în această încrengătură se află grupate și diferitele *mucegaiuri* (ciuperci microscopice sau macroscopice, cu tal uni- sau pluricelular) și *macromicetele*. Acestea din urmă au o organizare complexă, hifele lor fiind septate, pluricelulare, ce alcătuiesc plectenchimuri sau pseudoparenchimuri.

Ciclurile biologice ale fungilor sunt foarte complicate și variază ca elemente definitorii, în funcție de grupa taxonomică din care ele fac parte, de genul și specia în care acestea se încadrează.

În dependență de biologia ciupercii, în decursul existanței unui organism se pot remarca variate formațiuni morfologice distincte, implicate în înmulțirea diferitelor fungi, cum sunt, de exemplu – la ciupercile din ordinul *Agaricales* – corpii de fructificație (*carpozomele*, formațiuni pluricelulare care constau dintr-un picior și dintr-o pălărie), alcătuite din plectenchimuri.

Din punctul de vedere al biotehnologiei vegetale, experimentele de vitrocultură în care sunt implicate *coculturile* efectuate între inoculii cormofitici și fungii saprofiți, sau cei fitopatogeni, au stârnit un mult mai redus interes, în raport cu bolile produse plantelor de către viroze sau de bacte-

rioze. Acest fapt poate fi explicat şi prin aceea că, pe de o parte, la plante bacteriozele sunt mai uşor de identificat decât virozele, şi mai eficient de combătut prin tratamente chimice, în raport cu patologiile menţionate anterior, iar, pe de altă parte, în procesul de asepsizare a materialului vegetal, prealabil inoculării acestuia *in vitro*, bacteriile sau fungii, inclusiv sporii lor, sunt omorâţi, în regimul de vitrocultură persistând doar endoparaziţi, cu precădere *endopatomicozele*, infecţii prezente mai rar la explantele utilizate în fitovitrocultură.

1.2.2.4.1. Fitopatogenitatea de natură fungică

Diversitatea fungilor este extrem de mare, motiv pentru care, actualmente, în taxonomia vieţuitoarelor ei ocupă rangul de **regn**. Sunt cunoscute peste 100.000 de specii de fungi, care – în marea lor majoritate – au o nutriţie *heterotrofă*, saprofită sau parazită, foarte mulţi dintre aceştia provocând boli la plante (*Strange*, 2003).

Parazitozele fungice sunt severe şi multiple. Unii fungi fitoparaziţi pot să-şi desfăşoare întregul ciclu biologic pe o singură plantă gazdă, în timp ce alte specii îşi realizează ciclul lor de viaţă parazitând şi gazde intermediare, aşa cum este cazul ruginii grâului.

Cu toate că pagubele economice produse de *fungii patogeni* sunt uriaşe, până în prezent micozele vegetale nu au avut o implicare prea mare în studiile referitoare la coculturile efectuate între acestea şi fitoinoculi. Actualmente, în atenţia cercetătorilor din domeniul biotehnologiei vegetale se află aspectele legate de efectuarea de experimente în vederea selectării, în regim de vitrocultură, de genotipuri rezistente la anumite *patotoxine*, problematică care intră mai mult sub incidenţa studiilor de ameliorare sau a tehnicilor de inginerie genetică.

O serie de fungi microscopici, mai ales cei care trăiesc în sol, fiind *saprofiţi* interacţionează mai puţin cu plantele.

Fungii *simbionţi*, chiar dacă într-o fază iniţială – atunci când aceştia invadează o plantă gazdă – manifestă caractere de fitopatogenitate, ulterior acceptaţi fiind de celulele vegetale formează cu acestea *micorize*, pierzându-şi caracterul de patogenitate (subiect dezvoltat de noi, în continuare).

1.2.2.4.2. Fungii simbionţi. Micorizarea

Simbiozele *micorizale* sunt prezente atât în habitatele naturale, cât şi în ecosistemele agricole sau în cele forestiere.

BCU "VICTOR BABEŞ" UNIVERSITY LIBRARY

Fungii care fac parte din categoria ciupercilor *simbionte* sunt specii din clasele *Phycomycetes*, *Ascomycetes* și *Bazidiomycetes* (*Zamfirache* și *Toma*, 2000).

Micorizele se instalează fie în exteriorul zonelor de vârf ale rădăcinilor – *ectomicorizele* (fig. 10A) – învăluindu-le într-o pâslă de hife (situație care frecvent poate fi întâlnită la arbori, la graminee, la ceapă etc.), fie – la alte plante – în cortexul radicular, ele dezvoltându-se ca *endomicorize*, caz în care calea naturală de penetrare a hifelor fungice, în rădăcini, o constituie perișorii absorbanți. Hifele *endomicorizale*, după ce pătrund în celulele corticale ale rădăcinilor se ramifică și dau naștere, în interiorul acestora, la niște formațiuni care au fost denumite *arbuscule* (fig. 10B și fig. 11A și B), aspect care i-a determinat pe specialiștii din domeniul respectiv să numească *micorizele* de acest tip ca fiind *formațiuni micorizale arbusculare*, sau *fungi micorizali arbusculari* (FMA). Astfel de formațiuni asigură realizarea schimburilor reciproc avantajoase între celulele radiculare, corticale, și hifele fungice, la parametrii optimi.

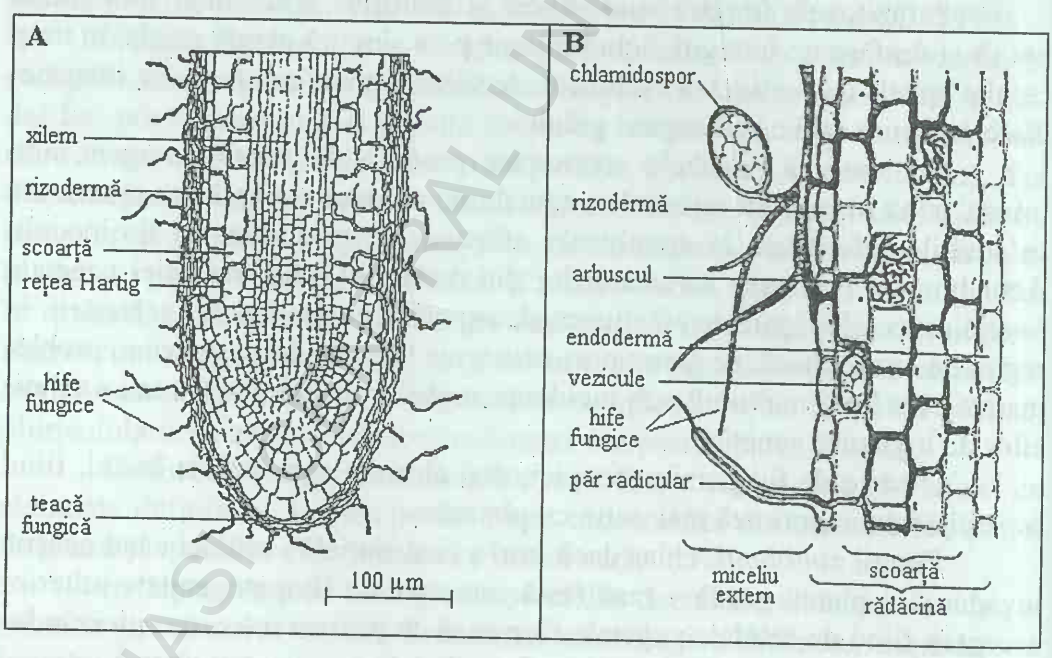


Fig. 10. Reprezentarea schematică a amplasării pe rădăcini a hifelor fungilor micorizali; A – secțiune longitudinală printr-un vârf de rădăcină cu *ectomicorize*; B – fungi micorizali vezico-arbusculari (după *Zamfirache* și *Toma*, 2000).

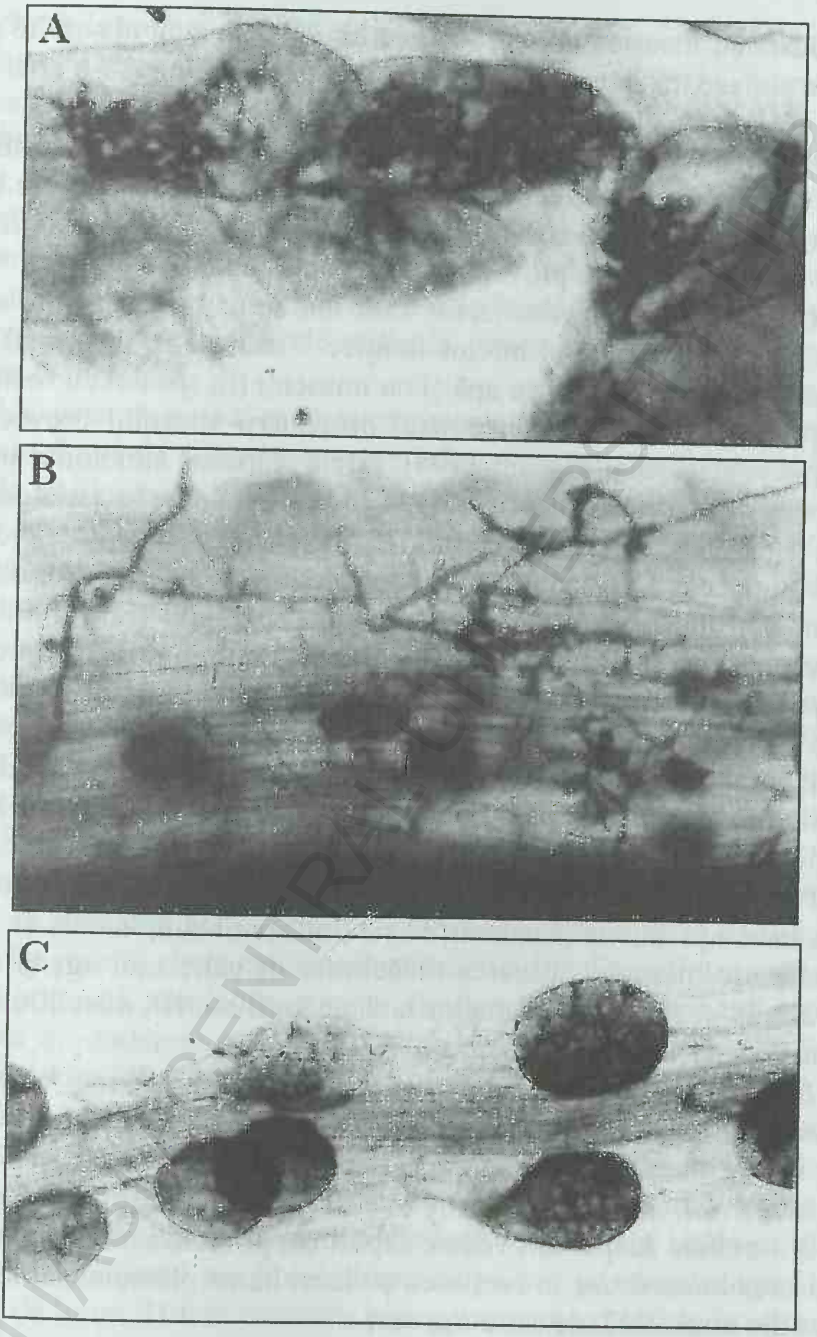


Fig. 11. Aspecte ale hifelor micorizale, arbusculare, generate în parenchimul cortical, radicular, de porumb; A şi B – hife şi vezicule provenite din diferenţierea arbusculelor; C – vezicule (20x) (*Maximilian* şi colab., 2003).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Odată cu moartea hifelor, lizatele lor celulare sunt absorbite și valorificate în sinteze, de către celulele plantelor cu care fungul s-a aflat în *simbioză*.

Pe lângă hife, în unele celule se disting și *vezicule* (fig. 10B și fig. 11A-C), situsuri în care se depozitează glicogenul, polizaharid care în cazul proceselor de *simbioză* se constituie în substanță de rezervă, sintetizat fiind de către fung din zaharoza provenită de la planta gazdă.

Rolul biologic al *micorizelor* este multiplu. În ecosistem, se apreciază că planta – cu ajutorul hifelor fungice – realizează, în primul rând, o mai bună aprovizionare a sa cu apă și cu nutrienți (în special cu fosfor), mai ales în perioadele secetoase, în sensul diminuării stresului provocat de o malnutriție (*Vestberg* și *Estaun*, 1994), hifele ciupercii simbionte susținând plantele și în situația carenței de oxigen în sol, evitându-se astfel instalarea hipoxiei la nivelul sistemului radicular. Totodată, o astfel de asociere susține planta și atunci când în mediu s-au produs modificări ale valorilor de pH, ori au apărut ioni toxici, sau oscilații ale salinității solului (*Rai*, 2001). Toate aceste procese favorizează, în final, o mai bună creștere și dezvoltare a plantelor *simbionte*, ele prezentând un conținut sporit în clorofilă, în glucide, în proteine și în amidon. În plus, *micorizele* ajută la o mai bună stabilizare a structurii solului, la o sporită acumulare și fixarea în acesta de variate substanțe chimice, facilitându-se și o mai crescută depunere de humus în glomerulele lui.

Prin intermediul *micorizelor* se realizează și instalarea în zona rizosferei a unui așa numit „biocontrol" natural, preîntâmpinându-se astfel – într-o oarecare măsură – atacarea rădăcinilor de către unii agenți fitopatogeni, mărindu-se rezistența plantelor la dăunătorii biotici, miceliile simbionte acționând și ca niște *biopesticide*.

Biocontrolul exercitat de către *fungii micorizali*, mai ales a celor *ectomicorizali*, în zona rădăcinilor, a fost menționat în literatura de specialitate – independent și simultan – de către *Linderman* (1994) și *Duchesne* (1994) (după *Rai*, 2001). Cercetările în acest domeniu se află în plină desfășurare. Nu trebuie scăpat din vedere faptul că, primele semnalări cu privire la implicarea *micorizelor* în creșterea și dezvoltarea plantelor au fost publicate încă din anul 1927, de către *Rayner*.

Bielenki (1973) a fost acela care a adus numeroase precizări referitoare la aportul benefic exercitat de *micorize* asupra activității biologice a plantelor cu care acestea se află în *simbioză*. *Bielenki* aprecia că, grație activității *micorizale* suprafața de absorbție a sistemului radicular crește de circa zece ori.

După *Lovato* şi colaboratorii (1996), *micorizele arbusculare* îndeplinesc o funcţie complexă, atât aceea de factori *bioregulatori* şi *bioprotectori*, cât şi cea de *biofertilizatori*.

În cazul exvitroplantulelor, rolul biologic al *micorizelor* este extrem de mare, ele sporind capacităţile adaptative ale materialului de plantat obţinut *in vitro*, la condiţiile mediului natural de viaţă, substratul în care acestea sunt amplasate în perioada de aclimatizare nefiind septic, face ca zona bazală a plantulelor scoase din *vitro* să se afle înconjurată de o multitudine de microorganisme cărora firavele radicule generate în regim de vitrocultură trebuie să le facă faţă.

Micoriza nu numai că ajută exvitroplantulele să se dezvolte mai bine, ci anumite tipuri de *micorize* măresc *toleranţa* plantelor la mediile poluate cu metale, unele specii de plante cu rădăcini *micorizate* servind la repopularea unor terenuri compromise, sau care prezintă rezidii metalifere (metale grele, sau deşeuri de Zn ori de Al); alte tipuri de *micorize* măresc rezistenţa rădăcinilor la stresul exercitat de către unele pesticide poluante, sau la reabilitarea unor terenuri care deţin resturi carbonifere. Astfel, dintre fungii *ectomicorizali* rezistenţi la poluarea solului cu metale, mai ales tolerante la rezidii cu Zn, în literatura de specialitate sunt menţionate speciile: *Suillus luteus*, *Rhizopogon roseolus*, *Hebeloma mesophaeum* şi *Tricholoma scalpturatum* (*Mleczko* şi colab., 1998). O rezistenţă sporită la prezenţa în sol a metalelor toxice a fost menţionată şi în cazul bacteriei *Pseudomonas*. *Mehrotra* (1998) a semnalat o mărire a rezistenţei plantelor la rezidiile persistente, existente în zonele miniere, prin inocularea acestora cu spori de fungi *micorizali*, *arbusculari*, *simbioze* cunoscute ca fiind realizate între unele specii de *fungi* originari *din India*, cum ar fi: *Acaulospora scrobiculata, Entrophasphora colombiana*, *Glomus aggregatum*, *G.ambisporum* şi *Scutellospora calospora* (*Rai*, 2001).

Verma şi colaboratorii (1998, 1999) (după *Rai*, 2001) au reuşit să izoleze, dintr-un sol deşertic din nord-vestul Indiei, hife de bazidiomicete aparţinătoare unui fung *endofit* numit *Piriformospora indica*, strâns înrudit cu specii din genul *Rhizoctonia*, uşor de cultivat pe medii sintetice, ale căror clamidospori piriformi pot fi colonizaţi cu succes pe plante de porumb, de tomate şi de tutun. Hifele rezultate prin germinarea sporilor, în aproximativ două săptămâni colonizează uşor suprafaţa rădăcinilor, fungul invadând ulterior celulele cortexului radicular. Ele au fost utilizate, cu foarte bune rezultate, şi în colonizarea unor specii silvice, tropicale, precum şi a unor plante medicinale. În general, în cazul plantelor medicinale *simbioza* dintre acestea şi fungi *micorizali* a condus la o stimulare atât a metabolismului primar, cât şi a celui secundar, provocând speciilor vegetale o generare sporită de pro-

duși secundari de metabolism, compuși atât de prețuiți în industria fitofarmaceutică, respectiv în fitoterapie.

1.3. STAREA CANCEROASĂ ÎN CELULELE ȘI ȚESUTURILE VEGETALE

Cercetările din domeniul vitroculturilor vegetale au adus mari servicii îmbogățirii cunoștințelor de fiziopatologie.

Autonomia multiplicării și a creșterii celulelor *tumorilor* vegetale, de manieră mai mult sau mai puțin anarhică, a suscitat interesul multor specialiști citofiziologi și geneticieni, precum și a cercetătorilor din domeniul biologiei moleculare.

La plante, ca și la om și la animale, tumorile au origini diferite. Ele pot fi provocate fie de agenți *fizici*, fie de *chimici*, fie de natură *biologică*, exogenă sau endogenă.

În viața celulelor afectate de o astfel de maladie se produc schimbări dramatice, soldate – în primul rând – cu declanșarea unei dezordini în *procesele de multiplicare* și de *creștere celulară*, o *alterare a sistemelor metabolice* (de sinteză și de degradare), o *modificare a raporturilor intra- și intercelulare*, în cadrul țesutului bolnav, dar și în ceea ce privește *relația țesutului tumoral cu celulele sănătoase*, din imediata lor vecinătate, sau aflate la o oarecare distanță de acestea, stări urmate de dobândirea de către celulele *tumorale* a unei *autonomii existențiale* etc.

Tumorile naturale, la plante, în marea lor majoritate sunt provocate fie de către *agenții biologici* vehiculanți de variații dăunători, ce în acest context au o origine *exogenă*, categorie în care se încadrează înțepăturile unor insecte ce-și depun ouăle în țesuturile vegetale și declanșază *tumorogeneza* prin compușii secretați de larvele acestora (cum este cazul unor viespi), dar și atacurile *virale*, cele *bacteriene* (produse preponderent de *Agrobacterium*) și mai rar cele *fungice*.

Tumorogeneza poate fi provocată și de cauze *endogene*, de esență *genetică* sau *fiziologică*. Starea *canceroasă*, de natură funcțională poate fi remarcată la vitroculturile vegetale. O astfel de manifestare este reprezentată de *hiperhidrie* (denumirea veche dată acestui fenomen fiind aceea de *vitrificare*) și de *anergism* (*habituație* sau lipsă de reacție).

Gautheret, în fața Academiei de Medicină din Paris, a abordat problema transformării tumorale a celulelor și țesuturilor vegetale, subliniind faptul că, atât la plante, cât și la animale, în procesul *cancerizării* celulele suferă modificări similare, care – în mare – prezintă aceleași caracteristici. Deci, cu toate că fenomenul de *tumorogeneză* are cauze diferite, în principal

alterările fiziologice şi biochimice care stau la baza *cancerizării*, respectiv a *autonomizării multiplicării* şi a *creşterii* celulare, la plante şi la animale par să fie asemănătoare.

Gautheret, în monografia sa publicată în anul 1959, se referea la problemele pe care le ridică subiectele de cercetare axate pe studierea ţesuturilor vegetale *canceroase* şi dificultăţile de interpretare şi de înţelegere a fenomenelor citofiziologice produse în interiorul celulelor *neoplasice*.

Pe lângă fenomenele *neoplazice* propriu-zise, trebuie studiate şi aspectele referitoare la reacţiile şi rezistenţa opusă de către celulele normale la prezenţa în ele, sau în apropierea lor, a unor astfel de procese, precum şi la posibila existenţă, la plante, a unor reacţii imune. De menţionat este şi faptul că, chiar şi după înlăturarea factorului care a declanşat instalarea *cancerizării*, şi a susţinut extinderea unui proces *neoplazic*, fenomenele provocate de acesta, precum şi proliferarea anarhică a celulelor scapă de sub controlul endogen, cu caracter inhibitor, menit să stăpânească şi să stăvilească multiplicarea anormală a celulelor, şi să anihileze acele reacţii care ar ajuta la redobândirea în celule a statutului de normalitate. Procesele *cancerigene*, la început restrâns localizate, treptat se extind şi exercită o influenţă negativă asupra fiziologiei plantei, uneori neoplasmul *migrând* în diverse alte organe ale acesteia, perturbând profund unele funcţiuni, afectând puternic întregul organism vegetal.

După cum preciza şi *Gautheret* (1959), tumorile înconjurate fiind de ţesuturi normale, cele două tipologii celulare, fiecare având un metabolism specific, stabileasc între ele conexiuni alterate, mai ales în ceea ce priveşte *nutrirea* celulelor *neoplazice*, proces care se desfăşoară cu dificultate în cadrul organului în care acestea se află, celulele *canceroase* fiind supuse unei *represii* din partea celulelor normale, nu numai prin *inaniţie*, ci şi prin *asfixie*. Pentru a putea fi studiate abilităţile unor astfel de celule, în comparaţie cu celulele normale, a fost indispensabilă explantarea acestora şi amplasarea lor în condiţii cât mai asemănătoare cu cele avute în organismul gazdă, situaţie care a putut fi realizată numai în regim de vitrocultură, sau prin *grefarea* lor într-o plantă sănătoasă, ori într-un fitoinocul. Astfel, în funcţie de proveniența explantelor, a naturii ţesuturilor, a compuşilor introduşi în mediile de cultură, a regimului adoptat pentru creşterea vitroculturilor, precum şi a analizelor întreprinse pe durata vitroevoluţiei acestora, s-au putut face progrese importante în ceea ce priveşte cunoaşterea *mecanismelor* implicate în fenomenele *tumorale*, la plante.

Boala *crown-gall*, indusă de un *principiu tumoral* sintetizat de *A. tumefaciens*, este un *neoplasm* care transformă ireversibil celulele vegetale normale în celulele *canceroase*; fenomenul se petrece gradat, în decurs de

câteva zile din momentul realizării contactului dintre bacterie și celulele sănătoase, la nivelul țesutului atacat instalându-se treptat un proces autonom și anormal de proliferare a celulelor care au fost infestate cu acest germen.

Țesutul *tumoral* de tip *crown-gall* a servit, în oncologia vegetală, timp de aproape 100 de ani, ca model experimental în studierea fenomenelor de *hiperplazie*. Astfel, încă în anul 1910, *Jensen* a demonstrat că celulele *tumorale* de sfeclă sunt apte de dezvoltare *autonomă*, în cazul în care unor plante sănătoase le sunt *grefate* țesuturi *tumorale*.

Smith și colaboratorii, în anul 1912, au semnalat – la plantele cu *crown-gall* – extinderea în timp a acestei boli neoplazice, în mod natural, cu formarea în corpul lor de *tumori secundare*.

Braun, într-o lucrare publicată în anul 1941, a specificat faptul că, la unele plante *tumorile secundare* iau naștere la o oarecare distanță de *tumora inițială*, și că acestea pot să fie „libere de bacterii".

Cu toate că, inițial, a fost respinsă ideea asemănării dintre *crown-gall* și *cancerul de la animale*, ulterior *White* și *Braun* (1942) au constatat producerea de tumori secundare la plantele care au fost inoculate cu țesut *neoplazic*, cu toate că celulele acelor tumori au fost găsite ca fiind lipsite de bacterii. Apariția, la plante, de tumori secundare, la distanțe relativ mari de punctul în care s-a operat inocularea inițială, a ridicat multe semne de întrebare, care se cereau lămurite, prin efectuarea de cercetări în această direcție.

Cancerul la plante, respectiv *tumorogeneza*, este extrem de complexă. Acest subiect a stat în atenția multor cercetători fitopatologi, dar și a celor de biotehnologie vegetală, multe generații de cercetători axându-și investigațiile pe studierea aspectelor referitoare la de *neoplasmul* prezent în corpul plantelor. După cum se va vedea în subcapitolul 1.4.1.3.4 și în capitolul 2, din prezentul tratat, acest subiect a fost pe larg investigat în cadrul unor cercetări efectuate de mai mulți autori, pe fitoinoculi cultivați în variate condiții ecofiziologice.

Importanța, noutatea și modernitatea acestui subiect, ne-a determinat și pe noi să ne documentăm în domeniul neoplasmului la plante, drept pentru care am studiat literatura de specialitate de profil și am publicat câteva articole de sinteză referitoare la cancerul vegetal, cu accentuarea aspectelor care privesc utilizarea vitrotehnicilor în scopul studierii aspectelor morfofiziologice, biochimice, ultrastructurale și chiar de biologie moleculară, implicate în tumorogenză și în metastazarea țesuturilor și a celulelor cormofitelor cultivate *in vitro* (*Cachiță* 2000, 2001; *Cachiță* și *Ardelean* 2004, 2005; *Cachiță* și *Crăciun*, 2004).

Un caz particular de cancerizare a celulelor fitoinoculilor este acela al *hiperhidriei*. Dat fiind faptul că în acest domeniu școala românească de

biotehnologie vegetală şi-a adus o contribuţie importantă mai ales prin studiile de ultrastructură efectuate de către *Cachiţă* şi *Crăciun* (1990), subiectul care va fi dezvoltat în capitolul 2 al prezentului volum.

1.4. VITROCULTURILE VEGETALE ÎN SPRIJINUL CERCETĂRII FENOMENELOR DE FITOPATOGENITATE ŞI DE FITOSIMBIOZĂ

1.4.1. COCULTURA SAU CULTURILE ASOCIATE DINTRE FITOINOCULI ŞI MICROORGANISME.

1.4.1.1. Consideraţii generale

Odată cu înregistrarea de succese în domeniul *fitovitroculturilor*, investigaţiile care se referă fie la studierea raporturilor de interrelaţionare, fie la cele de respingere, ce se stabilesc între un agent *„colonizant"* şi celula, ţesutul ori organul vegetal infestat, au devenit din ce în ce mai complexe, în astfel de examinări - pentru o cât mai mare acurateţe ştiinţifică – impunându-se analizarea diferitelor reacţii produse atât la nivel biochimic, cât şi la cel ultrastructural, la partenerii aflaţi în regim de *culturi asociate* (*cocultură*). Studiile trebuie întreprinse atât la nivelul celulelor, ţesuturilor sau a organelor gazde, cât şi a partenerilor *fitopatogeni* sau *simbionţi*. Cercetările efectuate în această direcţie au avut şi au în vedere fie prelevarea şi cultivarea *in vitro* – în condiţii controlate de mediu – a ţesuturilor bolnave, fie a fitoinoculilor sănătoşi, infestaţi fiind, artificial, cu variaţi agenţi fitopatogeni sau simbionţi. Pe de altă parte, s-a urmărit, separat, în regim de vitrocultură, evoluţia agenţilor *fitopatogeni* sau a celor *simbionţi*, inoculaţi fiind pe medii aseptice de compoziţii variate, în absenţa sau în prezenţa – mai mult ori mai puţin apropiată – a organelor, ţesuturilor sau a celulelor gazde tradiţionale, ori potenţiale, sau a altor microorganisme ori micelii concurente.

Încă din perioada de pionierat a studiilor din domeniul *vitroculturilor* vegetale, investigaţiile cercetătorilor s-au îndreptat în direcţia analizării *raporturilor* care se stabilesc între microorganisme şi celulele, ţesuturile sau organele plantelor cultivate *in vitro*, ce au fost *colonizate* cu unul sau mai mulţi agenţi biologici, fie ei *biotrofici*, *hemibiotrofici* ori *simbionţi*, experimentatorii concentrându-şi atenţia asupra examinării relaţiilor interactive care se realizează între aceştia şi fitoinoculi.

BUASVM CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Prin mijlocirea tehnicilor de *vitrocultură*, investigarea și evaluarea reacțiilor celulelor vegetale *sănătoase*, sau a celor *bolnave*, infectate fiind cu microorganisme *fitopatogene* sau *fitosimbionte*, comportă efectuarea de variate observații și analize. În *vitrocultură*, fiind vorba de un regim ecofiziologic artificial creat, și aseptic, în experimente trebuie să se aibă în vedere, în primul rând, asigurarea condițiilor de viață care să permită partenerilor asociați, atât inoculilor cormofitici, cât și microorganismelor, nu numai supraviețuirea, ci și desfășurarea la un nivel corespunzător a proceselor lor biologice.

Particularitățile de reacție ale celulelor cormofitice, inoculate fiind în regim de *vitrocultură*, și relațiile care se stabilesc între acestea și microorganismele care le anturează sau le invadează, precum și a acestora cu celulele vegetale amplasate la o mai mică sau mai mare distanță unele de altele, de locul de inserție, ori de infecție cu agentul fitopatogen sau simbiont, dar și a variatelor microorganisme, între ele – uneori diferite din punct de vedere taxonomic, sau ca tipologie fiziologică, în ceea ce privește cerințele lor de viață și de nutriție (de exemplu, a virusurilor cu bacteriile, ori a bacteriilor cu fungii) – aflate fiind într-o aceeași gazdă, se constituie în multiple situații și aspecte care se cer investigate, din cât mai multe unghiuri de vedere.

Majoritatea studiilor efectuate în această direcție, până în prezent, cu preponderență s-au axat pe subiecte referitoare la analizarea în regim de *vitrococultură* a comportamentului celulelor, țesuturilor și chiar a protoplaștilor cormofitici, fitoinoculii fiind asociați cu diferite microorganisme aflate – în mod natural sau artificial – instalate endo- sau exocelular, culturi monobi-, tri- sau polipartite, inoculate fiind pe medii de cultură de compoziții chimice variate, beneficiind de condiții ecofiziologice normale sau particulare etc.; în funcție de *tipul fitoinoculilor* implicați în experimente, *vârsta* acestora, *intervalul* scurs din momentul inițierii vitroculturilor și până la data examinării evoluției lor (aflați în *cultură primară* sau în *subcultură*, numărul de subculturi operate în antecedență și regimul de vitrocultură avut etc.), au fost urmărite și analizate reacțiile de ansamblu, sau cele particulare, înregistrate în diferitele condiții experimentale, pe baza acestora emițându-se judecățile de rigoare.

Manifestarea fenomenelor de *fitopatogenitate* și a celor de *simbioză*, amploarea și complexitatea acestora a fost și este studiată în regim experimental, de *vitrocultură*, situații în care s-au putut analiza varietatea *interrelațiilor* posibil de stabilit, în timp, între partenerii implicați într-o astfel de cultură (mai ales a fenomenelor petrecute la nivel structural și molecular) precum și *consecințele* acestora, în funcție de *condițiile de mediu*. În general, tipul reacțiilor exprimate în regim de *vitrocultură*, și amplitudinea aces-

tora, variază în funcție de *natura partenerilor* implicați în astfel de raporturi, existând particularități de exteriorizare dependente de *genul*, *specia* sau chiar de *genotipul* acestora, *asociațiile* fiind induse într-un *ecosistem creat artificial*. Reacțiile vor depinde de *starea fiziologică* a plantelor, a organelor, țesuturilor sau a celulelor atacate, *vârsta* acestora (ori a organismului vegetal din care ele provin), *tipul explantelor*, respectiv a fitoioculilor, *extinderea* şi *intensitatea* infecției, *natura agentului atacant*, dacă *contaminarea* este *unică* sau există o *poliinfestare*, patogenitatea multiplă sensibilizând planta într-o şi mai mare măsură, augmentând acțiunea distructivă a agentului sau a ansamblului atacurilor produse, copleşind țesutul, organul ori organismul atacat. În caz de *incompatibilitate* între parteneri, la nivel local sunt provocate *necroze* – pe zone restrânse sau generalizate – ori alte tipuri de disfuncții, fenomene care conduc treptat la o descreştere a potențialului biologic general al plantelor sau al fitoinoculilor (cultivați fiind într-un anumit regim ecofiziologic), tablou complex la care se adaugă *condițiile* termice, hidrice, de iluminare, compoziția substratului şi a atmosferei din recipientele de cultură etc. O situație creată *in vitro* prezintă o relativă constanță (stabilitate), existând posibilitatea repetabilității acestor experimente, în condiții de cultură relativ identice, ori de câte ori se doreşte acest lucru.

Vitroculturile vegetale au servit, şi servesc, ca *modele* experimentale în efectuarea unor studii de fitopatologie, astfel de cercetări ajutând la elucidarea multiplelor raporturi care se stabilesc între gazde şi agenții invadatori, studii ce conduc nu numai la clarificarea unor fenomene biologice, de interes general pentru cercetarea ştiințifică fundamentală, ci privesc şi abordări cu caracter aplicativ, cum sunt cele legate de obținerea de vitroplantule *libere de viroze* şi de *micoplasme*, sau crearea de *plante rezistente* la unele atacuri fitopatogene, ori *selectarea* şi multiplicarea *in vitro* a liniilor celulare ce posedă capacități morfologice, fiziologice sau biochimice care pot să susțină o potențială plantă gazdă în *prevenirea îmbolnăvirii* ei, sau în lupta acesteia cu un anumit agent parazit, *împiedicând instalarea* lui în celule, ş.a.m.d.

Fitovitroculturile aflate în „*parteneriat*" cu microorganismele pot fi *inițiate* fie prin vitrocultivarea unor *explante deja afectate de boli* (care, de exemplu, pot consta din țesuturi tumorale, prelevate de la o plantă bolnavă), fie prin *infestarea cu germeni* a unor fitoinoculi sănătoşi, prin învecinarea acestora cu un agent dorit, sau prin *injectarea unor germeni* în țesuturile acestora, ori prin *grefarea* în ei a unor fragmente tisulare purtătoare de microorganisme, sau prin *aplicarea* peste vitroculturile vegetale (traumatizate sau nu) de *extracte apoase*, proaspăt preparate din culturi de microorganisme ori din țesuturi bolnave, fie *diseminând* sporii sau hifele unor fungi peste fitoinoculi etc. Atât fitoinoculul, cât şi microorganismul infestant, sau colo-

nizant, pot să se afle în diferite stadii de dezvoltare. Alteori, pentru analizarea reacțiilor celulelor sau a țesuturilor vegetale, vitrocultivate fiind, se procedează la introducerea în mediile de cultură a *patotoxinei* specifice unui anumit tip de agent fitopatogen, urmărindu-se nu numai reacția fitoinoculilor, ci – în unele cazuri – operarea de *vitroselecții*, în vederea izolării de linii celulare mai rezistente la compușii fitotoxici sau enzimatici elaborați de un anumit agent fitopatogen, pe parcursul instalării acestuia în celula vegetală gazdă, ori a migrării lui în țesuturi sau în organe, în decursul desfășurării activităților lui vitale.

Deci, *cocultura* poate implica *asocierea* forțată sau naturală, în regim de *vitrocultură*, a doi sau a mai multor parteneri (care pot aparține la grupe taxonomice variate), fie a unui țesut cormofitic sănătos ori neoplazic, cu una sau două genuri, specii, sușe ori genotipuri de agenți fitopatogeni, diferiți, sau nu, din punct de vedere taxonomic.

Studiile au avut și au în vedere urmărirea și analizarea aspectelor referitoare la *receptarea* sau *respingerea* unei asocieri create forțat, *modul* de *instalare* al uneia ori a mai multor infecții, *reacția* și *transmiterea* acesteia sau a acestora în țesuturile inoculate, precum și în cele învecinate, *comportamentul partenerilor* de-a-lungul fazelor de vitrocultură, respectiv aflate în cultura primară sau în subcultură etc.

În regim de *vitrocultură*, sau după *transferarea ex vitro* a plantulelor generate pe medii aseptice, s-a studiat posibilitatea influențării dezvoltării vitro- sau a exvitroplantulelor, prin tratamente de *biotizare*, creându-se *biopreparate* care au fost testate pe fitoinoculi, pentru a se determina formarea la nivelul acestora a *bacteriorizelor* sau a *micorizelor*, asociații menite să asigure nu numai instalarea unei simbioze, ci și a unei *rizosfere* prielnice, atunci când exvitroplantulele vor fi amplasate în sol, *simbioze* care să confere rădăcinilor și plantelor un mediu optim de creștere. Reușita unei astfel de operațiuni oferă plantelor o mai bună dezvoltare, pe toată durata vieții acestora, desfășurată în condiții naturale.

Herman (2005d), într-un articol publicat în revista *Agricell Report*, specifica că o multitudine de microorganisme *endofite*, care în mod normal nu formează *simbioze* (cel puțin la actualul nivel de cunoștere acestea nu pot fi dovedite), pot exercita efecte pozitive asupra celulelor plantelor. Unele dintre acestea, însă, în regim de vitrocultură, uneori pot să se transforme în bacterii dăunătoare, imprimând inoculilor manifestări *patogene*, fenomen denumit *vitropatic*, termen lansat de *Leifert* și colaboratorii, în anul 1991. Din această cauză, în vitrocultură se impune efectuarea unui control sever în ceea ce privește prezența *in vitro* a contaminanților *vitropatici*, care, de regulă, sunt de natură bacteriană, întrucât ei – în unitățile axate pe micro-

propagarea, practicată în scopuri comerciale – produc mari pierderi de material biologic (*Leifert* şi *Cassells*, 2001). Astfel de fenomene pot fi stăvilite prin adăugarea de *antibiotice*, în mediile de subcultură. Antibioticele utilizate în acest scop pot fi: cefotaxima, streptomicina, gentamicina, kanamicina, nitrofurantrinina, novamicina sau sulfadiazina, folosite în concentraţii variate, cuprinse între 256512 mg/l, în cazul sufadiazinei, streptomicinei şi a kanamicinei, şi de până la 1024 mg/l, în situaţia utilizării penicilinei.

Cu toate că, la început de secol XX tehnicile de investigare a bolilor plantelor erau rudimentare şi ineficiente, încă din acea perioadă s-au făcut observaţii şi descrieri pertinente referitoare la modificările morfoanatomice şi fiziologice produse la nivelul organelor sau a ţesuturilor vegetale, de către variaţii germeni fitopatogeni. Rezultatele publicate în urma efectuării unor astfel de analize au marcat puternic, până în zilele noastre, cercetările întreprinse în domeniul vitroculturilor vegetale, ele determinând, în ultimele decenii, înregistrarea de progrese remarcabile atât în direcţia *stimulării* unor procese de *morfogeneză* (de caulo- şi rizogeneză), cât şi în *selectarea* de linii celulare *rezistente la boli*, ori în obţinerea de *genotipuri noi* – prin operaţiuni de inginerie genetică – cu capacităţi speciale în ceea ce priveşte fitorezistenţa lor la patogeni, sau în provocarea de *simbioze* dirijate, ori în *sporirea conţinutului* fitoinoculilor *în compuşi secundari de metabolism*, prin intermediul elicitorilor introduşi în mediile de cultură etc.

1.4.1.2. Scurt istoric cu privire la cercetările efectuate în decursul secolului XX în direcţia studierii reacţiilor inoculilor vegetali infectaţi, natural sau artificial, cu agenţi *fitopatogeni* sau *fitosimbionţi*

În cele ce urmează vom puncta, în ordine cronologică, principalele cercetări efectuate în secolul trecut, în direcţia studierii – în regim de vitrocultură – a reacţiilor unor explante vegetale, sănătoase sau bolnave, la prezenţa în componenţa acestora (sau în imediata lor vecinătate), a unor *agenţi fitopatogeni*, obligat paraziţi, ori a unor ţesuturi *tumorale*, neoplazice, de origini variate, sau a unor microorganisme *simbionte* ori saprofite.

Este interesant de semnalat faptul că, *tumorogeneza* – de natură variată – generată de virusuri, bacterii, ori cauzată de insecte, sau cea de origine genetică, ori mutagenă (indusă prin iradierea plantelor cu radiaţii γ sau x), sau hipertrofiile de provenienţă necunoscută, care au drept consecinţă producerea în celule de alterări fiziologice ori biochimice, a suscitat interesul cercetătorilor încă din primii ani ai secolului XX, epocă de pionierat a culturilor de ţesuturi şi celule vegetale. Astfel, în anul 1910, *Jensen* – efectuând

grefe de țesut *tumoral* de tip *crown-gall*, la plante normale de sfeclă (operate în scopul analizării capacității proliferative, autonome, a celulelor neoplazice, implantate fiind într-un organism sănătos) – a observat aptitudinea celulelor tumorale de a se multiplica, chiar și în regim de transplant tisular, semnalând abilitatea acestora de a transmite boala *canceroasă* celulelor sănătoase, care nu au fost afectate de o astfel de maladie. Această constatare a fost confirmată ulterior, experimental, și de către *White* și *Braun*, în cadrul unor cercetări publicate în anul 1942.

Tot în aceeași perioadă, *Bernard* (1911) a efectuat – *in vitro* – un experiment axat pe studierea reacțiilor *imune* ale plantelor, cu toate că în acea vreme nu se întrevedea încă posibilitatea obținerii de rezultate pozitive în ceea ce privește reușita vitrocultivării țesuturilor vegetale, deși, la orhidee, fenomenul de *simbioză* era deja cunoscut, precum și faptul că, în cadrul relațiilor de acest tip, rădăcinile tuberizate au fost neatinse de ciuperca simbiontă, în timp ce radicelele tinere erau invadate, cu ușurință, de hifele fungice. *Bernard*, și-a pus problema dacă, într-o astfel de situație, în țesuturile vegetale nu este implicată prezența unui compus chimic special, emis de către rădăcinile tuberizate. Pentru aceasta, pe mediu aseptic, gelificat, el a amplasat fragmente prelevate de la rădăcini de *Loroglossum hircinum*; la o oarecare distanță de explantele radiculare, *Bernard* a inoculat miceliul unei ciuperci *simbionte*. În cadrul experimentului descris, *Bernard* a observat că în imediata apropiere a fragmentelor de rădăcini tuberizate, hifele ciupercii – care până în acel moment se dezvoltau normal – și-au stopat creșterea. Repetând experimentul cu fragmente similare, provenite de la tuberculi de orhidee tratați termic (timp de 35 de minute), cu temperatura de 55^0C, *Bernard* a constatat că fenomenul de inhibare a creșterii hifelor ciupercii, în apropierea țesutului vegetal, nu s-a mai produs. Concluzia autorului a constat în aceea că, prin *termoterapia* aplicată tuberculilor de *orhidee*, prealabil explantării din ei de țesuturi și a inoculării acestora pe medii aseptice de cultură, s-a provocat o modificare a proprietăților compusului fungicidic (substanță neidentificată chimic), elaborat de țesuturile fitoinoculului în preajma fragmentelor de rădăcini tuberizate. După termoterapie, substanța eliberată de celulele cormofitice, în substratul comun de cultură pe care cei doi parteneri – fitoinoculul și ciuperca – trăiau *in vitro*, nu a mai respins creșterea hifelor fungului simbiont.

Nobécourt, unul dintre primii savanți cu lucrări de pionierat în domeniul culturilor de țesuturi vegetale, a fost preocupat de studierea aspectelor de fitopatogenitate manifeste în regim de vitrocultură. În anul 1927, el și-a susținut, la Lyon, teza de doctorat intitulată: „*Contribuții la studiul imunității plantelor*", lucrare în care, printre altele, doctorandul a confirmat ex-

perimental fenomenele care au fost descrise de către *Bernard*, încă în anul 1911. În lucrarea de doctorat, *Nobécourt* şi-a prezentat experimentele referitoare la studierea reacţiei variatelor tipuri de explante, inoculate *in vitro*, în apropierea cărora au fost cultivate diferite micelii de ciuperci endofite. Astfel, *Nobécourt* a amplasat în apropierea unor fragmente de rădăcini de morcov, pe un acelaşi mediu de cultură, hife de *Orcheomyces psychoides*. Filamentele fungice au crescut şi au înaintat pe mediul de cultură, până la producerea unui contact direct al ciupercii cu fitoinoculii, fără ca hifele să-i învăluie. Din fragmentele de morcov s-a regenerat calus, şi pe măsură ce vitalitatea celulelor calusului s-a diminuat, s-a „stins" treptat şi „imunitatea" acestuia faţă de hifele ciupercii. Experimentele au fost reluate de *Nobécourt* şi cu alte specii de ciuperci, obţinând rezultate similare. Deci, ca şi în cazul experimentul descris de predecesorul său *Bernard*, *Nobécourt* a remarcat faptul că, nu întotdeauna hifele ciupercilor invadează ţesuturile în prezenţa cărora fungii au fost cocultivaţi. Totodată, el a constatat că, în multe cazuri, celulele cormofitice nu au eliberat în substratul de cultură niciun compus antifungic (*Gautheret*, 1959).

Primele experimente metodice, referitoare la cultivarea *in vitro* a *organelor* vegetale, infestate cu agenţi fitopatogeni, obligat paraziţi, au fost făcute de către *Lewis* şi *Mc Coy*, date pe care aceştia le-au publicat în anul 1933. Ei au inoculat vitroculturi de rădăcini izolate de fasole, cu tulpini de *Pseudomonas radicicola*. Prin acest experiment, ei au demonstrat că în formarea nodozităţilor radiculare nu este necesară prezenţa părţii aeriene a plantelor (*Gautheret*, 1959).

Ulterior, *White* (1934) a efectuat numeroase studii, în regim de vitrocultură, pe rădăcini izolate de tomate, infectate cu virusul mozaicului tutunului (VMT), în scopul depistării raporturilor care se stabilesc între celulele radiculare ce deţin o infecţie cu acest agent fitopatogen şi celulele normale. *White* a fost de părere că, infecţia virală nu este prezentă numai în rădăcini, ci aceasta se răspândeşte în întrega plantă, demonstrând totodată că regiunea meristematică situată în vârful rădăcinilor rămâne lipsită de atac viral, gradul de incidenţă al infecţiei cu virusuri amplificându-se în zonele în care creşterea celulelor ţesuturilor radiculare se încetineşte, sau când aceasta este sistată. Dar, *White* nu a reuşit să infecteze cu virusuri rădăcini sănătoase de tomate, vitrocultivate.

Mai apoi, *Gioelli* (1938) – experimentând cu inoculi constând din ţesut *cambial* (meristem secundar), prelevat de la abori – a remarcat că ciupercile *saprofite* (de exemplu hifele de *Penicillium* sau de *Mucor*) invadează extrem de lent un astfel de explant, iar atunci când totuşi această infecţie se produce, atacul a avut loc cu precădere în zonele în care celulele nu s-au

mai aflat în curs de proliferare. În schimb, dacă în apropierea unui explant cambial a fost inoculat un agent patogen comun, de exemplu *Graphium ulmi* (parazit al ulmului), hifele fungice au invadat rapid țesutul meristematic, fenomen explicat prin aceea că această ciupercă a produs o *fitotoxină* care s-a dovedit a fi foarte nocivă, atacând celulele cambiale ale fitoinoculului.

Astfel de studii au fost reluate în epoca modernă, respectiv în ultimele decenii ale secolului XX, atât în scopul identificării, cât și al studierii – în regim de vitrocultură – a naturii *fitotoxinelor* elaborate și eliberate în mediul de cultură, precum și în celulele gazde, de către agentul fitopatogen cu care inoculul vegetal s-a aflat în regim de *cocultură*. Analizându-se modalitățile prin care potențiala plantă "victimă" poate să anihileze *fitotoxina* produsă de un anumit fung, cercetările au facilitat, ulterior, punerea la punct a unor proceduri de selectare *in vitro* a unor linii celulare rezistente la un astfel de atac, din acestea, uneori, reușindu-se regenerarea de genotipuri vegetale insensibile la invazia produsă de unele ciuperci fitopatogene, sau la *patotoxinele* acestora.

Descifrarea *mecanismelor* implicate în relațiile care se stabilesc între celulele cormofitelor și parazitul de natură *fungică*, au rămas – de-a lungul timpului – un subiect de interes și de actualitate, până în momentul de față, incitând cercetătorii la efectuarea, în acest domeniu, de investigații din ce în ce mai complexe.

În literatura de specialitate de la începutul secolului XX, se găsesc și unele referiri cu privire la faptul că *tumorile secundare*, prezente în organele unor plante (fenomene observate și descrise de către *Smith* și colaboratorii, în anul 1912 și, ulterior, de către *Braun*, în 1941), sunt *libere* de bacterii tumorogene. Dar, explantele tisulare prelevate din tumorile secundare, dovedite ca fiind libere de bacterii, inoculate fiind *in vitro* pe mediu *White* (1943), au crescut indefinit și au generat celule *anormale*.

Studiind comportamentul țesuturilor *tumorale*, în regim de vitrocultură, *White* și *Braun* (1942) au remarcat capacitatea celulelor *neoplazice*, infestate cu *A. tumefaciens*, de a se multiplica pe medii simple, constând doar din săruri minerale și zaharoză, lipsite fiind de vitamine și de fitohormoni; în subcultură, celulele respective pot prolifera în absența din ele a *bacteriilor fitopatogene*. Acest fapt i-a condus pe *Braun* și *White* (1943) la concluzia potrivit căreia *bacteriile* de tip *Agrobacterium*, aflate în *cocultură* cu țesuturile pe care le infectează, transmit celulelor gazde un „*principiu inductor tumorogen*" (PIT), ce transformă definitiv celulele vegetale infestate cu aceste bacterii în celule *neoplazice*.

Primele studii pertinente referitoare la asocierea *vitroculturilor* de țesuturi vegetale cu *virusuri* au fost publicate în anul 1943, de către *Segré-*

tain, el demonstrând faptul că, în regim de *cocultură*, în urma infectării unor fragmente caulinare sănătoase, de tutun, cu VMT, neoformațiunile tisulare regenerate *in vitro* – la nivelul acestor țesuturi – au prezentat infecția virală respectivă. Ulterior, *Segrétain* și *Hirth* (1953) au constatat că, în urma practicării de subculturi repetate, în țesuturile repicate *nu* s-a mai evidențiat prezența VMT, decât în primele luni de subcultură, contaminarea celulelor cu virus dispărând treptat, pe parcursul efectuării de pasări operate succesiv, pe medii proaspete, cu toate că fitoinoculii respectivi, în culturile inițiale, au fost virusați.

Morel (1944) a efectuat o serie de experimente axate pe studierea patologiei celulelor vegetale vitrocultivate, pentru început el cultivând calus de viță-de-vie infestat cu *conidii* de *Oidium*. După germinarea conidiilor, hifele ciupercii s-au dezvoltat rapid, acestea invadând țesuturile *calusale*, fără ca fungul să manifeste o cât de mică tendință de a se extinde și pe mediul nutritiv. Dar, după zeci de zile de *cocultură*, creșterea hifelor s-a diminuat treptat, ele generând corpi de fructificație, în timp ce celulele gazde ale ciupercii s-au necrozat, acestea dovedindu-se deosebit de sensibile la „atacul" fitotoxinelor eliberate în ele de către hifele fungice. Pentru menținerea în viață a miceliului, s-a impus repicarea și subcultivarea acestuia pe un mediu de cultură proaspăt.

Prima experiență reușită în obținerea unei vitroculturi *monoxenice* îi aparține lui *Morel* (1944) și a fost înregistrată la calusul de viță-de-vie infestat cu *Plasmopara*, un fung obligat parazit.

O primă *cocultură*, realizată între un fitoinocul *tumoral* și un agent fitopatogen se consideră că a fost obținută involuntar, de către *De Ropp* (1947 a și b), el asociind cu succes țesut de *crown-gall*, cu un țesut sănătos de floarea-soarelui. Relația dintre *bacteria* fitopatogenă *A. tumefacians* și țesuturile vitrocultivate a fost însă instabilă, deoarece în decursul operării ulterioare de repicări succesive ale țesutului tumoral, în celulele subcultivate infecția nu a persistat. Cercetările efectuate în această direcție au fost continuate de către *Gautheret* (1947a și b, 1948), pe *Topinambur*, precum și pe explante de *crown-gall* de morcov. Experimentele lui au permis relevarea faptului că, atât celulele țesutului gazdă, cât și cele bacteriene, s-au multiplicat, infestând – la un moment dat – chiar și substratul de cultură. Asociația însă nu a fost durabilă în timp.

Cercetările care au urmat, au relevat că în culturile asociate – realizate între fitoinoculi și agenți fitopatogeni – în general, din partea fragmentelor vegetale s-a manifestat o reacție de respingere a fungilor, de exemplu la vița-de-vie cultivată în prezența hifelor de rugină (*Morel*, 1948), fie în cel

al vitroculturilor tisulare de *Juniperus*, efectuate în prezența fungului parazit *Gymnosporangium clavariaeforme* (*Constabel*, 1957).

Astfel, *Morel* (1948) continuându-și cercetările, a realizat – într-o primă etapă, pe culturi tisulare de viță-de-vie – o vitrocultură de *Plasmopara viticola* și, separat, de *Uncinula necator*, sporii ambilor fungi germinând în aceste condiții, dar hifele care au luat naștere din ei *in vitro* au crescut mai încet decât în cazul unor infecții similare practicate în condiții naturale. Totodată, țesuturile infectate cu fungi, în vitrocultură au crescut și s-au diferențiat mai slab decât cele neinfectate cu micelii. Însă, creșterea lentă a miceliului nu i-a permis fungului să atingă stadiu de înmulțire sexuată.

Morel (1948), elaborându-și și el teza de doctorat în domeniul vitroculturilor de țesuturi vegetale, asociate cu diferiți agenți obligat paraziți, a efectuat variate experimente de *cocultură*. El a sesizat că țesuturile gazde, aproape întotdeauna au prezentat anumite manifestări pe care acesta le-a interpretat ca fiind reacții *imune*, *Morel* fiind primul care a demonstrat persistența infecției *virale* în calusurile contaminate cu VMT, în urma repicării repetate a țesutului calusal.

Vastul grup al *Uredinalelor* a făcut obiectul altor experimente efectuate de către *Morel*, în cadrul tezei sale de doctorat, el obținând nenumărate culturi de țesuturi vegetale, *asociate* cu fungi obligat paraziți – de tipul *Kuehneola albida, Puccinia antirrhini, P. malvacearum* și *Gymnosporangium clavariaeforme* – producând infestări artificiale realizate cu uredospori, teleutospori sau cu bazidiospori. Dar, multe dintre încercările sale de cocultură, în final eșuând.

În contrast cu experimentele efectuate de *White*, și publicate de către acesta în anul 1934, *Segrétain* (1943, 1948) și, separat, *Morel* (1948), au comunicat faptul că, printr-o simplă administrare a unor *extracte* preparate din țesuturile plantelor infectate cu viroze, la nivelul unor fitoinoculi, nu s-a realizat contaminarea cu virusuri a țesuturilor vegetale, vitrocultivate.

În anul 1951 *Cutter* și *Hotson*, și *Cutter* singur (1951), au reușit să inițieze culturi *monoxenice*, realizate între fungul *Gymnosporangium juniperi* obligat parazit, prelevat din gale cultivate *in vitro*, fără ca după o perioadă de timp această relație gazdă-parazit să se dezmembreze. În general, experimentele de acest tip s-au dovedit destul de dificile, întrucât relația gazdă-parazit este foarte greu de menținut, în timp (*Braun* și *Lipetz*, 1966).

Hotson și *Cutter* (1951) au fost de părere că, pentru ca un miceliu să poată infesta celulele vegetale aflate în vitrocultură, creșterea ciupercii trebuie să fie practicată, în prealabil, pe un mediu inert, optim pentru dezvoltarea fungului, și abia apoi hifele rezultate să fie inoculate pe un țesut gazdă, specific. În acest mod, s-a reușit infestarea unor colonii de țesuturi de

Craetaegus coccinea, cu *Gymnosporangium juniperi-virginianae*, planta infectată fiind gazdă intermediară pentru această ciuperca. La cele arătate, adăugăm şi rezultatele obţinute de *Kandler* (1951), care în experimentele sale a demonstrat o diminuare a creşterii rădăcinilor de porumb cultivate *in vitro*, infectate fiind cu variate tipuri de tulpini de bacterii, endemice în sol, precum şi cu filtrat de culturi de *Bacillus subtilis*.

Rezultate analoage au fost obţinute şi cu miceliul de *Erysiphe cichoracearum (Heim* şi *Gries*, 1953), hifele fungului fiind inoculate pe colonii de celule de floarea-soarelui, provenite din ţesut normal, sau pe explante derivate din tumori de tip *crown-gall*. Invadarea celulelor fitoinoculilor de floarea-soarelui de către hifele de *Erysiphe* s-a produs numai la culturile care au provenit din ţesut tumoral, ceea ce i-a determinat pe autori să considere că ţesuturile normale sunt mai rezistente la un astfel de atac.

În anul 1953, *Volcani* şi colaboratorii şi-au publicat studiile lor referitoare la reuşita realizării de asociaţii tisulare între *bacteriile* fitopatogene (în principal fiind vorba de *Erwinia*, *Bacillus subtilis* şi *B.polymyxa*) şi ţesuturile vegetale cultivate *in vitro*. Infestarea a fost posibilă în cazul unor vitroculturi efectuate cu ţesut de *Daucus*, *Solanum*, *Tagetes erecta* sau de *Vinca rosea*. Infecţiile cu *B. polymyxa* au provocat o *disociere* completă a celulelor ţesuturilor cocultivate *in vitro* cu acest bacil. Alte infecţii au evoluat mult mai discret, la nivelul culturilor instalându-se o depigmentare a ţesuturilor, fenomen secondat de intrarea fitoinoculilor într-o senescenţă mai mult sau mai puţin pronunţată. În toate cazurile menţionate, creşterea fitoinoculilor a fost puternic frânată. Totodată, *Volcani* şi colaboratorii (1953) au demonstrat, pe culturi variate, că bacteria *Erwinia carotovorum* (şi altele) – ca de altfel şi extractele preparate din mediile lor de cultură – au cauzat daune celulelor fitoinoculilor cu care s-au aflat în vitrocultură, ceea ce dovedeşte faptul că, preparatul obţinut din substratul de cultură pe care au crescut bacteriile respective produce o disoluţie a ţesuturilor vegetale, chiar şi în absenţa bacteriei din mediul de cultură pe care au fost cultivate explantele prelevate din potenţiale gazde ale acestui microorganism.

În anul 1955, *Zielinski* a obţinut vitroculturi *asociate*, realizate între celule de morcov şi o bacterie necunoscută, cultură care a fost stabilă în timp, infecţia bacteriană stimulând chiar creşterea celulelor vegetale.

Braun şi *Lipetz* (1966), de la laboratorul de fiziologie vegetală al Universităţii din Cambridge, au afirmat că boala *crown-gall* a fost utilizată – timp de mai bine de 50 de ani – ca *model* experimental în studiile de *fitooncologie*, tipul tumoral respectiv fiind considerat ca o hiperplazie bacteriostimulată. În vitrocultură, maladiile *neoplazice* provocate de această bacterie au caracteristic faptul că, proliferarea celulară are loc în absenţa fitohor-

monilor din mediul de cultură (*Braun*, 1958), bacteriile – ele însele – având capacitatea de a sintetiza auxină și citochinină. Astfel, *A. tumefaciens* inoculat pe explante vegetale, în regim de cocultură, generează la nivelul acestora un calus amorf (tip *crown-gall*), în timp ce la explantele de același tip, inoculate cu *A. rhizogenes*, s-a observat formarea de numeroase rădăcinițe (*Tepfer* și *Tempé*, 1981).

În ceea ce privește *simbioza*, menționăm că *Sturz* și colaboratorii (1977) au izolat, din nodozitățile de trifoi, 12 specii de *bacterii*, altele decât *Rhizobium*, ceea ce dovedește biodiversitatea acestor tipuri de asociații. Dintre bacteriile *simbionte*, mai puțin de 9% au constat din infecții produse de bacteria *Rhizobium leguminosarium bv. trifolii*. Dacă vitroculturile de trifoi au fost infestate cu tulpini de *Bordetella avium*, sau de *Bacillus megaterium*, ori de *Curtobacterium luteum*, la nivelul fitoinoculilor a rezultat o intensificare a creșterii țesuturilor, în raport cu situația înregistrată în cazul în care *coculturile* au fost realizate prin contaminare cu *R. leguminosarium bv. trifolii*. Formarea de noduli a fost stimulată atunci când *R. leguminosarium bv. trifolii* a fost inoculat – în *cocultură* mixtă– cu *B. insolitus*, ori cu *B. brevis*, sau cu *Agrobacterium rhizogene*, fenomen pus în legătură și cu procesele de *alelopatie*.

În epoca modernă, cocultura sau vitroculturile asociate au dobândit importante aplicații practice. Astfel, în ultimii ani, vitrotehnicile de *bacterizare* și de *micorizare* au devenit practici comune, procedurile fiind asociate cu micropropagarea, *biotizarea* îmbunătățind fie creșterea, diferențierea și regenerarea de vitroplantule, fie sporirea procentului de supraviețuire al exvitroplantulelor, pe parcursul aclimatizării acestora la mediul septic, natural de viață (sau și una și alta), tehnicile de *cocultură* ale fitoinoculilor cu anumite bacterii conducând la dobândirea de calități deosebite de către plantulele regenerate din astfel de asociații, printre care și aceea de stimulare a capacității lor *rizogene*.

Pillay și *Nowak* (1997) au semnalat faptul că, atunci când vitroplantulele de tomate au fost *cocultivate* cu o linie de *Pseudomonas*, masa radiculară și tulpinițele neoformate „*in vitro*" au fost semnificativ mai multe decât la vitroculturile martor, neinoculate cu acest microorganism; dar, chiar și în cazul în care colonizarea a fost făcută cu o specie *endofită*, creșterea vitroculturilor a fost stimulată (*Herman*, 1997c).

În anul 1998, la cel de al XXV-lea Congres Internațional de Horticultură de la Bruxelles, japonezii *Tadashi* și colaboratorii au descris o nouă tehnică, simplă, de micropropagare a orhideelor (*Cattleya*, *Dendrobium*, *Oncidium* și *Phalaenopsis*), precum și a altor plante (*Lilium*, *Hippeastrum*, *Kalanchoe* și *Asparagus*), pe medii de cultură fără a se proceda la asepsiza-

rea acestora pe cale fizică, şi fără ca inocularea să aibă loc în condiţii sterile. Pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor în mediul de cultură, în acesta s-a încorporat un amestec de hipoclorit de sodiu, cu dicloroisocianurat de natriu (total clor activ: 0,005-0,01%). După inocularea explantelor, suprafaţa mediului a fost pulverizată cu acelaşi tip de amestec dezinfectant, dar având o activitate mai ridicată a clorului, de 0,005-0,05%. Culturile au fost menţinute la aer, în regim neopturat. Se pare că plantulele regenerate în aceste condiţii nu au avut prea mult de suferit, dar, în schimb, s-au realizat serioase economii, prin suprimarea autoclavării, iar recipientele de cultură care au fost utilizate în acest scop au fost mai ieftine, ele nefiind termorezistente (*Herman*, 1998f).

Vitroculturile vegetale au pus la dispoziţia cercetătorilor noi căi de investigare a variatelor raporturi care se pot stabili între un agent fitopatogen şi gazda sa. Aceste cunoştinţe teoretice, după cum se va vedea, au servit la punerea în valoare a *calităţilor biologice* ale partenerilor implicaţi într-o astfel de relaţie, elaborându-se tehnici moderne de ameliorare, cum ar fi cele de *stres selecţie* (practicate *in vitro* în prezenţa agentului fitopatogen sau a patotoxinei acestuia), ori *izolarea de somaclone* cu rezistenţă sporită la un anumit tip de atac toxic, sau crearea de *noi genotipuri*, prin efectuarea de operaţiuni de inginerie genetică (executate chiar şi la nivel de protoplaşti), ori prin proceduri diverse care privesc transfer şi inserţie de gene în genomul celulei vegetale gazdă, provenite de la un agent microbian sau fungic etc. Prin astfel de procedee s-a urmărit obţinerea de *plante transgenice*, care să deţină caractere de *rezistenţă* la atacul produs de un anumit agent fitopatogen, sau la prezenţa în ţesuturile gazde a unei anumite antipatotoxine, generată de acestea, în timp ce prin *hibridare somatică* s-a căutat să se realizeze o *combinare a caracterelor parentale* ale unor plante de cultură, cu cele de *patorezistenţă*, existente în unele specii preluate din flora spontană etc. În general, fungii fitopatogeni sunt aceia care produc şi eliberează în mediul lor de viaţă toxine, care, în timp, distrug celulele, ţesuturile, respectiv organele şi organismele pe care ei le parazitează. Investigarea fenomenelor *patofiziologice* şi *metabolice*, la nivel citofiziologic, şi chiar de biologie moleculară, urmăreşte depistarea modificărilor intervenite la nivelul barierelor constituite de biomembrane, şi nu numai, precum şi găsirea căilor prin care să se poată selecta, *in vitro*, genotipuri vegetale cât mai rezistente la astfel de compuşi.

În schimb, de un mare interes s-au bucurat, şi se bucură, în continuare, vitroculturile vegetale destinate efectuării de experimente în care fungii *simbionţi* sunt utilizaţi ca obiect de studiu, în scopul elaborării de proceduri de *micorizare*, combinaţii benefice realizate între fungii exo-, endo-

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI BIOLOGIE

sau exo-endomicorizali și plantele de cultură. Astfel de preparate servesc la o mai rapidă și optimă formare a *micorizelor*, la nivelul sistemului radicular, mai ales în cazul transferării *ex vitro* a plantulelor generate în mediul aseptic, în acest mod stimulându-se o mai facilă acomodare a exvitroplantulelor la viața în regim de normalitate.

1.4.1.3. Studierea *patologiei* celulei vegetale, în regim de vitrocultură

Cultivarea *in vitro*, pe medii mai mult sau mai puțin complexe, a speciilor de microorganisme obligat fitoparazite este dificilă, iar în cazul virusurilor aceasta este chiar imposibilă, cu toate că în compoziția substratului de cultură se are în vedere adăugarea substanțelor pe care agentul parazitar, în mod natural, le dobândește din celulele cormofitelor în care el trăiește. Dacă, în cazul bacteriilor, și în cel al fungilor obligat paraziți, astfel de culturi – în absența celulelor gazde – pot să supraviețuiască, o scurtă perioadă de timp, creșterea autonomă *in vitro* a virusurilor, la actualul nivel al cunoștințelor, este absolut imposibil de realizat.

Miller și *Maxwell* (1983) au făcut o sinteză bibliografică cu privire la evaluarea rezistenței plantelor la boli, prin studierea – în sistem de cocultură – a țesuturilor calusale, a celulelor sau chiar a protoplaștilor vitrocultivați împreună cu variate microorganisme fitopatogene, simbionte sau saprofite, analizând acest fenomen din punctul de vedere al interacțiilor care se stabilesc în astfel de situații precum și rolul fitoalexinelor și al elicitorilor, în funcție de speciile asociate cu regimul ecofiziologic adoptat de către experimentatori.

1.4.1.3.1. Particularități morfofiziologice și biochimice manifeste la nivelul fitoinoculilor infestați artificial cu *virusuri* sau cu *viroizi*

Așa cum specificau *Braun* și *Lipetz* (1966), spre deosebire de celulele animale, culturile de celule vegetale infectate cu virusuri nu manifestă evidente fenomene de suferință.

White, în primele sale experimente (1934), a urmărit reacția vitroculturilor de rădăcini de tomate, infestate cu VMT și a analizat distribuția particulelor virale în celulele apexului radicular, ori în cele adulte sau bătrâne, în funcție de situarea lor la o anumită distanță de vârful meristematic, aflate fiind în cultură primară, ori în trepte succesive de subcultură.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bergmann, în anul 1959(b), a realizat o infestare artificială, controlată, cu virus, a unor rădăcini vitrocultivate, pentru aceasta utilizând un extract preparat din plante virusate. Mai mult decât atât, *Hirth* şi *Lebeurier* (1962) au reuşit să infesteze vitroţesuturi *habituate* (*anergice*) de tutun, cu acid ribonucleic provenit de la VMT.

O situaţie particulară a fost descrisă de către *Morel* (1948), în cazul efectuării de vitroculturi de tutun, provenite dintr-un ţesut bolnav de *crown-gall* suprainfectat cu *virusuri*, demonstrând primul posibilitatea inoculării şi a creşterii VMT fie într-un ţesut normal, fie într-unul *habituat*, fie într-un ţesut suferind de *crown-gall*. Totodată, *Morel* (1948) a cultivat virusul X şi Y în ţesut normal sau *habituat*, de tutun şi de măselariţă.

Tot în anul 1948, *Augier* de *Montgremier*, împreună cu colaboratorii săi, a publicat rezultatele cercetărilor sale referitoare la menţinerea în vitrocultură a unei infecţii complexe realizată între VMT şi virusul mozaicului castravetelui, pe ţesut *tumoral* de *crown-gall*, de tutun. Ei au demonstrat, prin teste serologice, că acest ţesut a prezentat un nivel de virusare de 3-4 ori mai slab decât acela determinat în frunzele plantelor din natură; în cazul ţesutului *habituat*, concentraţia virală a fost mai scăzută decât aceea surprinsă la tipul de vitroculturi menţionate anterior.

După *Kutsky* şi *Rawlins* (1950), prezenţa *regulatorilor de creştere* în mediul de cultură utilizat pentru vitrocultivarea ţesuturilor de tutun a exercitat efecte contradictorii asupra răspândirii VMT-ului în celulele fitoinoculate, reacţia surprinsă variind în funcţie de natura şi concentraţia compuşilor testaţi. Astfel, prezenţa ANA în mediul de cultură, în concentraţie de 10^{-4}%, a determinat o descreştere a infecţiei virale în ţesuturile infestate cu VMT. În schimb, *Segretain* (1952) a specificat faptul că, laptele din nuca de cocos (care în mod natural deţine un conţinut ridicat de citochinine), în culturi tisulare constând din fragmente caulinare de tutun, a favorizat o intensificare a infecţiei cu VMT. Ulterior, *Hirth* şi *Segretain* (1956) au precizat că, prezenţa laptelui de nucă de cocos în mediul de cultură al calusului de tutun, a stimulat în acesta producerea de diviziuni celulare, micşorând astfel titrul viral. Aceste experimente au fost reproduse de către *Kassanis* (1957), pe ţesut de *crown-gall* suprainfectat cu VMT. Cercetările lui au confirmat descreşterea titrului viral în cazul prezenţei în mediul de cultură a laptelui de nucă de cocos, fenomen pus pe seama citochininelor existente în acesta.

Varietăţi de păr şi de măr au fost obţinute ca libere de viroze, prin *grefarea* apexurilor virusate pe plantule portaltoi, sănătoase, după metoda imaginată şi practicată de *Morel* şi *Martin* (1952), şi de către *Quak* (1977).

Tot referitor la condiţiile de cultură, *Hildebrandt* şi colaboratorii (1954) au menţionat că, ţesuturile normale şi cele tumorale, de *crown-gall*,

infectate cu VMT, au crescut bine la temperaturi cuprinse între 20 și 30°C și mai slab la valorile extreme de 16° și de 37°C, infecția virală fiind maximă la temperaturi de 24°-28°C, și minimă la 36°C.

Între anii 1958-1960, o serie de cercetători și-au publicat rezultatele studiilor lor, referitoare la faptul că tiouracilul (un antimetabolit), în concentrații de 10^{-6} g/ml, a inhibat răspândirea infecției cu VMT, în rădăcinile de tomate cultivate *in vitro* (*Bergmann*, 1959 a), diminuând totodată și creșterea țesuturilor aflate în vitrocultură, concluzii care, ulterior, au fost confirmate și de către alți experimentatori (*Hildebrandt*, 1958; *Hildebrandt* și *Riker*, 1958; *Kassanis*, 1957); în schimb, adaosul de *uracil* în substratul de cultură al țesuturilor tumorale de *crown-gall* a stimulat atât răspândirea infecției virale, cât și creșterea masei tumorale. Pe de altă parte, *Hildebrandt* și colaboratorii (1954) au precizat că *6-metil purina*, prezentă în mediul de cultură, în concentrație de 0,01 mg/l, a exercitat un efect toxic asupra virusului, diminuând însă și creșterea celulelor gazde. Aceste experimente i-a condus pe autori la concluzia potrivit căreia, în astfel de situații, în cultură, între celule infestate și virusuri se instalează o competiție în ceea ce privește sinteza de nucleoproteine.

Wu și colaboratorii (1960) au reușit infectarea cu VMT suspensii celulare de tutun. Ei au constatat că, într-o aceeași cultură, cu cât celulele au fost mai tinere, și au prezentat o capacitate mai rapidă de creștere, cu atât infecția virală a fost mai scăzută decât în celulele mai bătrâne.

Virusurile, respectiv genomul viral, se inserează mai greu în genomul plantelor, ceea ce face ca vectorii de tip viral să fie folosiți, rareori, în operațiunile de inginerie genetică, cu toate că, în natură, în celulele vegetale gazde, infecția virală se exprimă spontan. Un impediment în valorificarea vectorilor virali în operațiunile de inginerie genetică constă și în faptul că, virusurile nu au șanse de a se integra în meristeme, grație sistemului natural al celulelor acestora de a anihila acest tip de infecții, ceea ce face ca în ele genomul viral să nu se poată exprima.

Totuși, vitroculturile vegetale au permis punerea în evidență a fenomenelor de „*protecție încrucișată*" a plantelor, în raport cu infecțiile virale, situație care se referă la aceea că, organismele cormofitice infectate cu un anumit virus nu se mai suprainfectează cu un alt virus înrudit, ceea ce face ca la unele plante de cultură (de exemplu la cartof) să existe o cale de protejare a lor antivirus, printr-o infectare artificială a acestora cu tulpini virale mai puțin păgubitoare, *imunizându-le* împotriva unei suprainfecții cu virusuri deosebit de dăunătoare (*Wang* și *Hu*, 1980; 1982). Aceste descoperiri au deschis un nou domeniu de cercetare în fitopatologie, cu aplicații practice importante în direcția *preimunizării* unor specii de interes economic, prin

intermediul contaminării plantelor respective cu tulpini virale mai puțin dăunătoare.

O metodă alternativă de obținere a plantelor de crizanteme, libere de *viroidul* CSVd, a fost aceea a regenerării de lăstari din apexuri caulinare vitrocultivate pe mediu cu adaos de *amantadină*, un agent chimic anti*viroidal* (*Horst* și *Cohen*, 1980).

Metodele moderne de detectare a variatelor maladii, prin intermediul tehnicii RT-PCR (în l. engleză RT = *reverse transcription*; PCR = *polymerase chain reaction*) permit identificarea în masa vegetală a bolilor *viroidale* și a *fitoplasmozelor* (*Candresse* și colab., 1988; *Mumford* și colab., 2000).

După precizările aduse de *Shelton* și *Warren*, la sesiunea anuală a Societății pentru Biologie Experimentală a Universității din Leicester, din aprilie 1992, calusul și suspensiile celulare provenite din plante contaminate sistemic cu VMT au *„pierdut" virusul* în urma efectuării de subculturi practicate succesiv, fapt care i-a condus pe autori la concluzia potrivit căreia astfel de experimente pot servi ca modele în studierea mecanismelor capabile să determine producerea unei infecții și, ulterior, suprimarea atacului viral prezent în celulele vegetale (*Herman*, 1992a).

Electroterapia a fost utilizată în scopul eliminării virusurilor din celulele vegetale, încă din anul 1996, de către un colectiv de cercetători mexicani conduși de *Lozoya-Saldaña*. Aceștia au imersat în apă tulpini de cartof, infectate cu virusul X, și le-au expus – timp de de 5 minute – la un curent electric cu intensitatea de 15 mA, după care apexurile lor caulinare, și cele axilare, au fost prelevate și cultivate *in vitro*. Capacitatea regenerativă a mugurilor a fost de 40-80%, iar plantele formate din aceștia aproape 100% au fost libere de virusuri. Autorii menționați au considerat că, în eliminarea virozelor din țesuturile vegetale, comparativ cu termoterapia, un astfel de tratament s-a dovedit a fi superior, ca eficacitate, el fiind și mai economic din punct de vedere energetic. Pe lângă aceasta, la nivelul inoculilor a fost stimulată și organogeneza (după *Herman*, 1996c).

Tot pentru eliminarea infecțiilor virale, dar și a celor bacteriene, *Hernández* și colaboratorii, din Cuba, au patentat – în anul 1997 – o metodă de *electroterapie*, aplicabilă la nivel de culturi de apex caulinar. Tratamentul electroterapeutic a fost practicat timp de aproximativ cinci minute, materialul vegetal fiind expus la o tensiune electrică de 5-30 volți; procedura a fost eficientă în eliminarea tulpinilor virale de tip VMCA și BVCA, precum și a bacteriilor: *Clavibacter*, *Erwinia* și *Xanthomonas*, din trestia de zahăr, și a virusului PLRV, din cartof. În plus, tratamentul a stimulat și creșterea mate-

rialului vegetal cultivat *in vitro*, precum și regenerarea de mai multe plantule, la nivelul acestuia (*Herman*, 2000b).

La cea de a 3-a sesiune de Biotehnologie vegetală REDBIO '98, a țărilor Americii Latine, *Bernal-Martinez* (din Mexic) – împreună cu colaboratorii săi, din Cuba – au prezentat, la cartof, o metodă deosebit de eficientă de eliminare a virusurilor din celule, în procent de 64%, tot printr-o *electroterapie* (tratament efectuat cu o tensiune de 5 volți, aplicat timp de 5 minute); procedura a fost secondată de explantarea meristemelor apicale (cu talia de 0,9-1,5 mm) și cultivarea lor *in vitro*. Potrivit autorilor menționați, comparativ cu metodele de suprimare a virozelor pe cale chimică sau termoterapeutică, electroterapia s-a dovedit a fi mult mai eficientă în eliminarea infecțiilor virale (*Herman*, 1998d).

În schimb, un grup de cercetători din Israel, de la Centrul Volcani al Organizației de Cercetări Agricole (Departamentul de Virologie), condus de *Wang*, au descoperit că prin *crioconservarea* apexurilor caulinare de viță-de-vie, vitrocultivate, s-a realizat, cu succes, eliminarea din acestea a virusului A. Reușita eliminării din apexuri a acestui virus a fost independentă de procedurile de crioconservare adoptate, respectiv congelare prin vitrificare sau prin încapsulare, și deshidratare. Eliminarea virusului din apexurile caulinare de viță-de-vie, prin crioprezervare, a fost posibilă și la explantele apicale cu mărimea de 2 mm; procentul de supraviețuire al inoculilor, și viteza lor de creștere, au fost dependente – în cazul explantelor mai mici de 2 mm – de dimensiunea acestora. Dar, inoculii meristematici, propriu-ziși, crioconservați, numai în procent de 12% au regenerat plante libere de virusul în cauză (*Herman*, 2003a).

La crizanteme, specie mult cultivată de către iubitorii de flori din întreaga lume (îndeosebi de către cei din Japonia), anual se înregistrează pagube însemnate din cauza atacului provocat acestora de către *viroidul* CSVd și de *virusul* TSWV, boli care sunt foarte greu de eliminat prin metodele convenționale de vitrocultivare a meristemelor, caz în care procentul de reușită este foarte scăzut, chiar dacă plantelor mame le-au fost aplicate perioade lungi de termoterapie, cu temperaturi pozitive coborâte, așa cum se indică a fi utilizate în cazul prezenței în plante a unui atac *viroidal* (*Hosokawa* și colab., 2004b). Astfel, *Hosokawa* și colaboratorii (2004b) au descris o tehnică de obținere a plantelor de crizanteme libere de infecții *viroidale*, prin regenerarea de lăstari din primordiile foliare ale meristemelor apicale, prelevate de la plante certificate ca fiind libere de viroze. Principiul metodei a constat în atașarea primordiilor foliare, explantate din meristemele apicale de crizanteme, vitrocultivate, culturilor de vârfuri radiculare de crizanteme sau de varză, utilizate ca țesuturi „doică"; în cazul în care s-au

utilizat apexuri radiculare, acestea au fost detaşate de la vitroplantule de crizanteme ce au provenit de la lăstari aparţinători unor soiuri la care procedurile convenţionale de culturi de meristeme s-au dovedit a fi eficiente, plantele donatoare de astfel de apexuri având certificat de atestare a faptului că ele au fost libere de *viroidul* CSVd şi de *virusul* TSWV; de la ţesuturile „doică" de varză, provenite de la vitroplantulele care au luat naştere din seminţe germinate în condiţii aseptice, s-au prelevat explante meristematice, radiculare, apicale, cu dimensiuni de 0,5 mm; în ambele situaţii, rata ridicată de multiplicare a celulelor meristemelor „doică" a permis regenerarea din ele de muguraşi şi de tulpinişe, în final de plante de crizanteme libere de *viroidul* CSVd, agent patogen foarte greu de eliminat prin alte practici. În operaţiunea de prelevare a meristemelor s-a utilizat un microscop prevăzut cu micromanipulator, secţionarea acestora făcându-se cu raze laser (*Hosokawa* şi colab., 2004a). La crizanteme, în urma aplicării unei astfel de proceduri, procentul de supravieţuire al inoculilor a fost de 23%, iar dintre plantele regenerate 28,6% au fost libere atât de *virusuri*, cât şi de *viroizi*. Dacă ţesutul de ataşare („doică") a constat din apex radicular de varză, procentul de regenerare de lăstari a fost de 68,7%, iar proporţia de plantule lipsite de atac *viral* şi *viroidal*, după 30 de zile de la iniţierea experimentelor, s-a cifrat la 35,9%. De menţionat este şi faptul că, şi la vitroplantulele la care boala a fost prezentă, gradul de infectare al acestora a fost foarte scăzut. Utilizarea ca ţesut „doică" a vârfurilor radiculare, mai ales a acelora de varză, a făcut ca adeziunea temporară a primordiilor foliare de crizanteme, de inoculii „doică" de varză, să conducă la regenerarea – din explantele meristematice – de lăstari sănătoşi (*Hosokawa* şi colab., 2004a şi b). *Hosokawa* şi colaboratorii (2004b) au afirmat că acestă metodă a permis obţinerea de rezultate bune şi în regenerarea de plante libere de boli la căpşun, la garoafe şi la măr. În general, acest tip de vitroculturi se realizează pe medii lipsite de regulatori de creştere, pentru a se preveni apariţia de mutaţii, întrucât, adeseori, astfel de substanţe pot induce – mai ales în situaţiile descrise – producerea de fenomene de mutageneză (*Zhu* şi colab., 1993).

Prin regenerarea de plante libere de viroze, din culturi de meristeme, se realizează şi eliminarea – la nivelul vitro- şi exvitroplantulelor – a o serie de bacterii, cum sunt: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Bacillus*, şi altele.

La cel de al 11-lea Congres IAPTC&B de la Beijing, din China, din anul 2006, *Haque* şi colaboratorii (de la Universitatea din Nagoya), au prezentat o lucrare în care aceştia au descris cercetările lor referitoare la obţinerea, pentru prima dată, cu eficienţă ridicată, de plante libere de viroze, din vitroculturi de explante *meristematice radiculare* (după *Herman*, 2006c).

Metoda a fost practicată la usturoi, folosindu-se două trepte de cultură. Astfel, într-o primă treaptă, explantele meristematice – prelevate din vârfurile radiculare ale plantelor infectate chiar şi cu trei tipuri diferite de virusuri – au fost cultivate pe mediu de bază MS, suplimentat cu amestec de 1 μM ANA şi 10 μM BA. În mai puţin de 35 de zile, la aproximativ 80% dintre inoculii meristematici s-au regenerat multiplii muguraşi. Testele virusologice au scos în evidenţă însă, că – pe această cale – au fost anihilate numai două din cele trei tipuri virale prezente în explantele iniţiale. Într-o a doua treaptă de vitrocultură, mugurii au fost explantaţi de pe tulpinile regenerate în prima treaptă de vitrocultură, această a doua cultură fiind efectuată pe un mediu MS, lipsit de regulatori de creştere. În această a doua fază de cultură a fost eliminată şi cea de a treia formă virală, care persista în fitoinoculii meristematici, radiculari.

Coculturile dintre microorganisme şi fitoinoculi, atunci când paraziţii sau agenţii biotizanţi sunt *endofiţi*, se realizează involuntar. Aşa cum precizau *Toth* şi colaboratorii, de la Obuda Kerteszeti Kft din Ungaria, la Simpozionul Internaţional de Culturi *in vitro* şi de Ameliorare în Horticultură, de la Debrecen, din 30 noiembrie 2006, după 16 ani de vitrocultivarea continuă a 18 specii de garoafe, în condiţiile iniţierii vitroculturilor din seminţe asepsizate, în ţesuturile acestora au fost identificate virusuri criptice. Dar, pe lângă virusul criptic al garoafelor, în ţesuturi au fost descoperite şi virusuri criptice ale sfeclei de zahăr (cum sunt BCV 1, 2 şi 3), care au rezistat în fitoinoculii de garoafe, pe parcursul a peste şapte ani de subcultură. După *Toth* şi colaboratorii (2006), virusurile criptice sunt atât de bine adaptate la gazdele lor, încât cu toate că ţesuturile acestora suferă schimbări radicale, în ceea ce priveşte condiţiile în care ele trăiesc, virusurile supravieţuiesc în fitoinoculi chiar şi după mai mult de 10 ani de micropropagare practicată *in vitro* (*Herman*, 2007b).

1.4.1.3.2. Vitroculturi vegetale asociate cu *bacteriile fitopatogene* sau cu cele *fitosaprofite*

În general, regimul de *cocultură* trebuie să corespundă – din punct de vedere fizic şi chimic – cerinţelor optime de viaţă pentru doi, trei sau mai mulţi parteneri, aflaţi împreună în vitrocultură, respectiv atât pentru fitoinoculi, cât şi pentru variatele tipuri de microorganisme asociate cu celulele sau cu ţesuturile vegetale, vitrocultivate.

Coculturile realizate între bacteriile fitopatogene şi ţesuturile vegetale s-au practicat în trei moduri, şi anume: fie infecţiile *bacteriene* au fost produse la nivelul unor fitoinoculi sănătoşi, fie microorganismele au fost

asociate – într-o aceeaşi cultură – cu fitoinoculii, aflaţi la o oarecare distanţă de aceştia, fie *in vitro* au fost cultivate explante care au deţinut în structurile lor variaţi germeni microbieni, *endogeni*.

Marea majoritate a cercetărilor efectuate cu bacterii vitrocultivate, în regim de *cocultură* cu fitoinoculi, au fost întreprinse cu *Agrobacterium* (vezi subcapitolul 1.2.2.1.2.). Astfel de experimente s-au concretizat prin publicarea de rezultate teoretice şi practice foarte valoroase, studii care abundă în literatura de specialitate din ultimii douăzeci de ani.

În cele ce urmează, vom menţiona o parte dintre experimentele efectuate în domeniul culturilor asociate realizate între fitoinoculi şi *bacterii* preponderent *fitopatogene* şi cele de natură *simbiontă*, subiect care face obiectul unui viitor subcapitol (1.4.1.4.1.).

De regulă, microorganismele *parazite* sintetizează şi eliberează *patotoxine* în plantele pe care, sau în care, ele trăiesc. În schimb, microorganismele *simbionte*, şi cele *saprofite*, elaborează şi desorb în exteriorul lor numai *enzime*. Diferenţa de comportament fiziologic al acestora explică toleranţa pe care o manifestă organismele vegetale faţă de microorganismele nepatogene, precum şi faptul că, între asemenea vieţuitoare, atât de îndepărtate din punct de vedere filogenetic, se pot stabili raporturi de *coabitare*.

Gautheret menţiona, în monografia sa publicată în anul 1959 că, culturile *asociate* – realizate între fitoinoculi şi *bacterii* – au fost obţinute absolut întâmplător, în anii 1947-1948, de el şi de către *De Ropp* (1947) în cursul efectuării de studii care au avut ca obiect de analiză, cercetarea reacţiei la vitrocultură a celulelor ţesutului de *crown-gall*. Cei doi autori menţionaţi, observând că pe parcursul repicării vitroculturilor iniţiate din inoculi constând din ţesut *tumoral* de floarea-soarelui, de topinambur şi de iarba-lui-tatine, din celulele gazde ale infecţiilor cu *A. tumefaciens* s-a remarcat eliminarea treptată a tuturor bacteriilor de acest tip, conţinute în ele, cu toate că genul *Agrobacterium* poate fi cultivat relativ uşor, pe medii nutritive de compoziţii variate.

După cum s-a arătat în subcapitolul 1.4.1.2., în afara culturilor vegetale de tip *crown-gall*, în anul 1953 *Volcani* şi colaboratorii şi-au publicat cercetările lor cu privire la utilizarea coloniilor tisulare în efectuarea de coculturi între ţesuturile de rezervă, radiculare, de *Daucus*, *Solanum*, *Vinca*, ori de *Tagetes*, cu specii *bacteriene* fitopatogene, din genurile *Erwinia* (*E. carotovora*, *E. aroideae*, *E. atroseptica*, ş.a) şi *Bacillus* (*B. subtilis* şi *B. polymyxa*). La culturile asociate, realizate între fitoinoculi şi *B.polymyxa*, prezenţa în celule a acestei bacterii a condus la dezmembrarea completă a coloniei tisulare.

Fallot (1958), cultivând fragmente caulinare de viță-de-vie, în asociere cu *B. megaterium*, a constatat că în prezența acestui microorganism, din explante s-a regenerat un calus bogat, care a manifestat *rizogeneză*; în schimb, la nivelul aceluiași tip de fitoinocul, neinfectat cu bacilul respectiv, în culturi efectuate pe un mediu de cultură cu auxine, nu s-a evidențiat formarea de rădăcini. Acest fenomen de stimulare a *rizogenezei*, la nivelul explantelor vegetale aflate în regim de cocultură cu unele bacterii a fost și este valorificat în scopuri practice, datorită unor studii efectuate de către cercetătorii biotehnologi, mai ales în ultimii 30 de ani.

Gautheret (1959) a formulat și a lansat expresia de „*colonie tisulară*", definind-o ca o entitate constituită dintr-o grupare de celule *tumorale*, histologic omogenă, care se multiplică de manieră anarhică și care-și păstrează capacitatea de proliferare în condițiile separării ei din tumoră, chiar și în situația repicării repetate a țesuturilor respective, menținându-se asocierea celulelor acestora cu agentul fitopatogen. Dar, în timp, această asociere nu s-a dovedit a fi durabilă.

În atenția specialiștilor din domeniul vitroculturilor vegetale, în permanență s-au aflat, și se află, studiile legate de detectarea, identificarea și caracterizarea microflorei contaminante, existente la nivelul materialului vegetal și al fitoinoculilor, întrucât la baza a o serie de insuccese în inițierea și menținerea regimul aseptic, în recipientele de cultură, accidental apare mai ales o floră microbiană și fungică, *saprofită*.

Încă în anul 1983, *Horsch* și *King* au semnalat prezența la nivelul mediilor de cultură sterilizate, și a fitoinoculilor, a unor bacterii de „suprafață" sau „acoperitoare", care în timp se ancorează de țesuturile vegetale, existența lor nefiind sesizabilă în mediul asepsizat, dar care – pe parcursul fazelor de vitrocultură – pot să exercite asupra inoculilor o acțiune inhibitoare sau stimulatoare, ori pot să nu producă nici un fel de efecte. Atât autorii citați, cât și, ulterior, *Holland* și *Polacco* (1994) au considerat că utilizarea termenului de bacterii *latente*, în scopul definirii acestor infecții de suprafață, nu este corespunzătoare întrucât, în general, în fitopatologie prin această noțiune se subînțelege acele bacterii care sunt inactive, și care nu produc efecte adverse.

Long și colaboratorii (1987) au relatat faptul că, unii agenți contaminanți, latenți, persistenți în țesuturile vegetale, se mențin în fitoinoculi chiar și după operare de repetate subculturi, la un moment dat, în mediul de cultură reamarcându-se colonii bacteriene, uneori vizibile și macroscopic. Astfel de bacterii rămân în țesuturile vegetale, vitrocultivate, într-o stare latentă, deoarece mediul de cultură – adecvat susținerii capacității regenerative și de creștere a fitoinoculilor – conține, în ceea ce privește microorganismele în

cauză, o concentrație prea ridicată de zaharoză, condițiile osmotice create de glucidul prezent în mediu fiind inadecvate manifestării în condiții optime a metabolismului respectivelor bacterii fitopatogene, sau chiar și a celor saprofite (după *Herman*, 1996e).

Tot în anul 1987, *Nowak* – de la Colegiul Agricol din Noua Scoție – la un workshop internațional organizat în Canada, a lansat termenul de ***bacterizare***, sau de *bacteriorizare* (noțiune sinonimă cu aceea de *microbizare*), mai ales pentru denumirea relațiilor de tip *simbiont*, realizate între speciile cormofite și celulele bacteriene, termen care s-a impus treptat în literatura de specialitate (*Herman*, 1997c).

Dată fiind importanța elucidării aspectelor legate de persistența unor infecții bacteriene sau fungice, la nivelul fitoinoculilor, în anul 1987 a fost organizat un prim simpozion internațional axat pe studierea aspectelor referitoare la contaminarea vitroculturilor vegetale cu bacterii, sau cu alte microorganisme.

În anul 1991 *Cassells*, și ulterior *Viss* și colaboratorii (1991), iar în anii 1991-1992 *Leifert* și colaboratorii, au publicat rezultatele cercetărilor lor în care s-a consemnat nu numai faptul că în vitroculturile vegetale, adeseori, supraviețuiesc bacteriile de „suprafață" (de acoperire) sau cele *endofite*, și au demonstrat importanța efectuării unui *screening* al culturilor atât în ceea ce privește examinarea aspectelor vizuale, cât și detectarea și indexarea – prin intermediul mediilor selective – a bacteriilor identificate ca fiind prezente în substrat, ori pe, sau în țesuturile vegetale, având un caracter contaminant sau asociativ.

Astfel de situații, speciale, pe unii cercetători i-a determinat să fie mai circumspecți atunci când afirmă că o fitovitrocultură este „sterilă" sau „axenică", întrucât în cazul efectuării unei simple examinări vizuale a vitroculturilor, sau atunci când indexarea contaminării se face pe un singur tip de mediu de cultură, se poate vorbi doar despre o vitrocultură complet „curată", fără să se cunoască, cu exactitate, dacă ea este pe deplin aseptică. Dar, pentru a indexa corect prezența bacteriilor *epi-* și *endofite*, active sau latente, trebuie avut în vedere că tratamentele cu antibiotice pot conduce la obținerea de false rezultate, din cauză că o parte dintre compușii folosiți pentru înlăturarea infecțiilor sunt remanenți la nivelul materialului vegetal vitrocultivat, în timp, ei exercitând efecte reziduale, nedorite. În cazul bacteriilor *endofite*, prezența antibioticelor în mediul de cultură destinat creșterii *in vitro* a fitoinoculilor nu are sorți de succes în anihilarea infecțiilor.

Acest nou tip de *vitrotehnici* asociate au progresat, mai ales grație experimentelor efectuate de către *Nowak* și colectivul său (1995). Ei au izolat, de pe suprafața rădăcinilor de ceapă, o tulpină de *Pseudomonas* pe care

au cocultivat-o cu vitroculturi de cartof. Procedura a condus nu numai la înregistrarea unei stimulări a creșterii fitoinoculilor respectivi, ci și la o sporire a *rizogenezei* (ca număr de rădăcini formate, și ramificarea acestora), și a creșterii în lungime a tulpinilor, concomitent cu o lignificare mai pronunțată a acestora. În raport cu plantulele de cartof, rezultate printr-un sistem clasic de micropropagare, lipsit de *bacterizare*, exvitroplantulele de cartof – provenite dintr-o astfel de cultură – au suportat semnificativ mai bine stresul de transfer a lor în mediul natural de viață, în momentul trecerii acestora în substrat septic. Plantele de cartof, provenite din lotul *bacterizat*, au putut fi multiplicate indefinit, împreună cu bacteria asociată, aceasta menținându-se ca *endofită* atât în țesuturile plantelor, cât și în minituberculii neoformați pe parcursul subculturilor. În condiții naturale, aceste plante au dat naștere la culturi mai uniforme, mai bine dezvoltate, care au format stoloni și tuberculi mai repede decât fitoinoculii de la lotul control, nebacterizat. În plus, la lotul bacterizat s-a constatat manifestarea unei *rezistențe sporite* a plantelor la atacul agenților patogeni, cum ar fi la cel cu *Verticillium albo-atrum*. Rezistența sporită a plantelor bacterizate cu tulpini de *Pseudomonas*, după *Nowak* ar fi datorată atât unei mai puternice lignificări a vaselor lemnoase, cât și a creșterii concentrației de fenoli în celulele vegetale. Continuându-și cercetările cu coculturi de *Pseudomonas*, pe tomate, ardei, castraveți și pe pepeni verzi, în anul 1995 *Nowak* și colaboratorii au publicat un studiu în care aceștia au întărit rezultatele obținute de ei și prin experimente similare făcute la cartof (după *Herman*, 1996f). De la acea dată, *Nowak* – singur sau împreună cu colectivul său (timp de 19 ani) – a perseverat în efectuarea de cercetări în această direcție, precum și în publicarea de articole referitoare la creșterea variatelor tipuri de culturi de țesuturi sau de celule de cormofite, în regim controlat de vitrocultură, contaminate fiind cu anumite microorganisme, care pot exercita o acțiune benefică asupra fitoinoculilor (*Herman*, 1996f; 2005e).

Un colectiv de cercetători de la Gembloux (Belgia), condus de *Kamoun* (1996; 1998), a descoperit că o contaminare cu bacterii, surprinsă la plantele de prun, micropropagate *in vitro*, insesizabilă vizual, a putut fi pusă în evidență doar dacă un omogenat tisular preparat din zona bazală a inoculilor a fost cultivat pe un mediu bacterian, standard. După o perioadă de incubare a acestui amestec, etalat pe plăci de cultură optime pentru dezvoltarea microorganismelor, după un timp s-au putut identifica cel puțin patru tipuri de *Pseudomonas syringiae* și unul de *A. rhizogenes* (*Herman*, 1998f și g).

Contaminarea materialului vegetal cu bacterii (sau cu fungi), *epi-* sau *endofite*, ridică probleme – adeseori grave – care pot compromite pe mo-

ment, sau pe termen lung, vitroculturile de fitoinoculi. Uneori, în vitroculturile vegetale, pentru eliminarea infecțiilor bacteriene de la nivelul viitoarelor explante, se practică tratarea materialului vegetal cu *antibiotice*, sau chiar cultivarea fitoinoculilor pe medii de cultură în care aceşti compuşi sunt prezenți permanent (*Tanprasert* şi *Reed*, 1997; *Reed* şi colab., 1998; *Thomas*, 2004).

Continuându-şi cercetările efectuate în domeniul *persistenței* unor bacterii *latente*, în vitroculturile vegetale micropropagate, *Thomas* (2004) a surprins manifestarea unui declin morfofiziologic al plantulelor triploide, de pepeni verzi, după al 5-lea sau al 6-lea an de subcultură, la nivelul fitoinoculilor instalându-se un declin al procentului regenerativ, observat la butaşii utilizați în micropropagare, scăzându-le astfel, semnificativ, rata lor de propagare. Astfel, numărul de lăstari regenerați din butaşi şi de noduri prezente pe tulpinițele neoformate din mugurii axilari, creşterea suprafeței foliare, îngălbenirea frunzulițelor bazale (sau chiar necrozarea limburilor), hiperhidricitatea acestora, scăderea capacității rizogene (chiar şi pe mediu de înrădăcinare), sunt tot atâtea fenomene negative observate la vitroculturile de pepeni verzi aflate la un număr de ani de vitrocultură, situație declanşată încă după cel de al 2-lea an de la inițierea micropropagării acestora.

Invesitgând încărcătura bacteriologică a vitroculturilor de pepeni verzi, cu o vechime de 6 ani, *Thomas* a identificat – utilizând medii bacteriologice test – prezența în cultură a mai multor bacterii *latente*, printre care se numărau patru linii de *Bacillus*, una de *Pseudomonas* şi o linie de *Aeromonas*. În urma operării unei asepsizări de suprafață a explantelor cu soluții de NaOCl sau de $HgCl_2$, vitroplantulele regenerate din fitoinoculi au manifestat o proliferare caulinară şi o rizogeneză, respectiv o organogeneză mult îmbunătățită, situație care însă s-a menținut doar unul sau două cicluri de subcultură, întrucât bacteriile *endofite* au supraviețuit tratamentelor asepsizante.

Pentru a radicaliza efectul bacteriostatic, *Thomas* a efectuat şi tratamente cu antibiotice. Suprimarea bacteriilor de către antibiotice a depins de natura şi concentrația antibioticului folosit, dar şi de specificul bacterian. Dar, după un timp, subpresarea de către antibioticul prezent în mediu de cultură a unor bacterii a permis manifestarea activității în substrat a altor bacterii. Concluzia lui *Thomas*, în cazul acestor experimente, a fost aceea că, nici anihilarea bacteriilor cu antibiotice nu s-a dovedit a fi o măsură radicală. Cea mai eficientă metodă, dar care nu a înlăturat complet şi definitiv bacteriile *latente*, a constat în introducerea în mediul de cultură, de multiplicare sau de rizogeneză, a 50 ml/l gentamicină sau cefazolină, ocazional combinând acest tratament cu o decontaminare a explantelor. Un astfel de

tratament a permis menținerea vitroculturilor la un grad ridicat de proliferare și de creștere, timp de 7 ani, la nivelul plantelor regenerate, scoase din teren, nesemnalându-se vreo variabilitate a acestora, din punct de vedere genetic.

Tot un declin al rizogenezei și a formării de lăstari, la explantele de viță-de-vie vitrocultivate, a fost observat de *Thomas* și *Prakash* (2004), după 6-7 ani de micropropagare. La 75-100% dintre cazuri, mediile de cultură au fost contaminate cu cel puțin șase tipuri de bacterii latente. Adaosul de antibiotice în mediul de cultură s-a dovedit a fi inutil, întrucât ele au fost toxice pentru explante. În consecință, autorii citați au conceput utilizarea unei alte metode de dezinfecție și de vitrocultură, constând în sterilizarea suprafeței apexurilor caulinare cu o soluție de 0,1% clorură mercurică, după care acestea au fost plantate câte un explant per flacon de cultură. Înainte de inoculare, suprafața mediului a fost acoperită cu un strat de gentamicină sau/și cefazolină, în concentrații de 50 mg/l. După 1-2 luni de vitrocultură, au fost selectați fitoinoculi de viță-de-vie liberi de bacterii, care s-au menținut ca atare timp de patru cicluri de subcultură. Aceste vitroculturi libere de bacterii *latente* au manifestat o capacitate rizogenă de 80-100%, fitoinoculii regenerând un mare număr de plantule, care au putut fi aclimatizate *ex vitro*, cu succes. Prin această procedură, *Thomas* și *Prakash* au considerat că au reușit să pună la punct o metodă fezabilă de micropropagare, de lungă durată, prin care s-a realizat eliminarea din vitrocultură a microorganismele „ancorate" pe fitoinoculii de viță-de-vie.

Într-o lucrare publicată de către *Thomas* și colaboratorii, în anul 2008 (după *Herman*, 2008b), s-a semnalat faptul că în fitoinoculi persistă o serie de microorganisme *endofite*, *latente*, care se mențin în subculturi realizate timp de numeroase repicaje, fapt ce ridică serioase probleme cu privire la gradul de asepsie al vitroculturilor, dar și legat de potențialul rol al unor astfel de microorganisme în producerea de variații somaclonale, ori în obținerea de compuși secundari de metabolism – mai ales în regim de vitrocultură – sau în ce măsură pot fi făcute corelații între bacteriile *endofite* și diferitele boli sau infecții produse în corpul uman.

Tot în cercetări recente, *Zaspel* și colaboratorii (2008 – după *Herman*, 2009) au demonstrat că o serie de bacterii *endofite*, prezente în vitroculturi de *Robinia pseudoacacia* – micropropagate *in vitro* timp de 14 ani – în tot acest timp nu au exteriorizat la nivelul țesuturilor vitrocultivate nicio formă de simptom. Analizele însă au dovedit că, fitoinoculii de salcâm erau contaminați cu 20 de genotipuri ale mai multor tipuri de bacterii, aparținătoare la șase genuri de *actinobacterii* și de proteobacterii. Aceste genotipuri au fost găsite ca fiind în mod obișnuit *endofite*, sau ca bacterii asociate cu plantele, ele existând – de altfel – și în sol sau în apă. Examinările secven-

țiale au demonstrat că multe dintre genotipurile bacteriene menționate au fost similare ca structură ARN cu *Microbacterium flavescens*. *Zaspel* și colaboratorii au fost de părere că, în ceea ce privește rolul și modul de acțiune al bacteriilor *endofite*, cunoștințele noastre sunt încă incomplete, cercetările viitoare urmând să elucideze și să detalieze numeroase aspecte, încă în mică măsură studiate.

La începutul anilor '90 au fost lansate și cercetările care au scos în evidență efectele favorabile exercitate de prezența în vitroculturile vegetale a unor bacterii cu acțiune *benefică* asupra creșterii și dezvoltării fitoinoculilor, luând o amploare deosebită studiile din domeniul *bacterizării*. Acest fapt a fost dovedit de către *McAfee* și colaboratorii (1993), la pin și la larice, și de către *MacRae* și *Van Staden* (1993) la eucalipt. Ei au semnalat că în condițiile bacterizării explantelor speciilor menționate anterior, cu tulpini de *A. rizogenes*, s-a înregistrat o mai bună *înrădăcinare* a exvitroplantulelor regenerate din acestea (din punct de vedere calitativ și cantitativ), cultura asociată influențând favorabil atât comportamentul plantulelor, cât și mai buna constituire a sistemului lor radicular, pe durata perioadei de aclimatizare, ceea ce a crescut substanțial și procentul de supraviețuire al acestora.

Într-un studiu făcut de *Visser-Tenyenhuis* și colaboratorii (1994), s-a stipulat faptul că, printr-o cocultivare a explantulelor de *Geranium*, cu tulpini selectate de *Bacillus*, la nivelul acestora s-a *stimulat diferențierea* celulelor și *embriogeneza* somatică, chiar și la genotipuri recalcitrante, din acest punct de vedere. Astfel, la inoculii cultivați cu *Bacillus* s-a reușit generarea de 14 embrioni somatici, per un explant de hipocotil de mușcată, de patru ori mai mult decât în cazul cultivării aceluiaș tip de explant în regim axenic, respectiv la care s-a remarcat, în medie, neogeneza de numai 2,5 embrioni per inocul. Densitatea bacteriană, în mediul de cultură, a fost de $0,47 \times 10^{-5}$/ml. Dacă numărul de bacterii/mililitru a fost mai scăzut, s-au redus și exemplarele de embrioni regenerați per explant; dar, totuși, procentual, neogeneza de embrioni somatici a fost net superioară aceleia marcată la lotul control, nebacterizat (*Herman*, 1994b).

Cercetările lui *Nowak*, și ale colectivului său, au reținut atenția specialiștilor din domeniul culturilor de țesuturi și celule vegetale, în ceea ce privește efectele favorabile pe care le pot exercita unele infecții bacteriene sau fungice asupra vitroculturilor cormofitice, contaminări care pot conduce la o îmbunătățire a rezultatelor obținute în micropropagare. Ulterior, numeroși cercetători au relevat multiplele efecte benefice înregistrate în cazul contaminării (naturale sau artificiale) a culturilor de țesuturi vegetale cu anumite microorganisme *saprofite* sau parazite, *epi-* sau *endofite*, altele decât cele specifice raporturilor de *simbioză* (*Herman*, 1996f). Astfel, unele

contaminări, cu bacterii sau cu fungi, în regim de cocultură cu inoculi vegetali, pot stimula *performanțele regenerative*, *organogene*, *metabolice*, *creșterea* și *diferențierea* fitoinoculilor, prevenind *hiperhidria* și *ameliorând capacitatea de aclimatizare* la mediul septic a exvitroplantulelor provenite din astfel de vitroculturi.

La simpozionul din anul 1996, din Irlanda, intitulat: *Bacterian and Bacteria-Like Contaminants of Plant Tissue Cultures* (după *Herman*, 1996d), numeroase studii au reținut atenția cercetătorilor care au participat cu comunicări la acea manifestare științifică. Astfel, *Wilhelm* – de la Centrul de Cercetări din Seibersdorf (Austria) – a descoperit efectul *fungistatic* exercitat de *bacterizările* practicate în fitovitrocultură, cu anumite specii sau tulpini de microorganisme. El a adus la cunoștința participanților că, *bacterizarea* practicată cu *Bacillus subtilis* (sușe izolate de pe tulpini și frunze de castan comestibil, de liliac sau de trandafir), a exercitat *efecte inhibitoare* asupra creșterii *fungului Cryphonectria parasitica*. Rezistența plantelor regenerate din astfel de vitroculturi, la fungul *C. parasitica*, s-a manifestat și la progeniturile obținute din explantele subcultivate, provenite din culturile *bacterizate* cu *B. subtilis*, acesta elicitând sistemul de apărare al plantelor. Una dintre tulpinile de *B. subtilis* a exercitat un efect fungistatic și asupra altor ciuperci fitopatogene, cum sunt: *Alternaria radicina*, *Botrytis cineraria*, *Fusarium*, *Gerlachia niveale*, *Sclerotinia sclerotiorum* și *Rhizoctonia solani* (*Herman* 1996f).

Dar, descoperirile făcute în direcția evidențierii efectelor binefăcătoare pe care pot să le aibă microorganismele, asupra fitoinoculilor, în condițiile cocultivării lor împreună cu țesuturile vegetale, sunt din ce în ce mai numeroase și mai importante, și ele deschid noi direcții de cercetare și de valorificare practică a acestor investigații, în scopul sporirii *rizogenezei*, a *rezistenței fitoinoculilor* sau a *exvitropantulelor* la *condiții de stres*, a *stimulării proceselor de creștere*, *de organogeneză*, de mărire a *rezistenței acestora la boli*, *de modificare a metabolismului secundar* al țesuturilor vitrocultivate etc. În cele ce urmează, vor fi prezentate – în ordine cronologică – câteva descoperiri făcute în direcțiile de cercetare menționate anterior.

Gorskaya și *Karanova* (1996), de la Institutul „Timiriazev" de Fiziologie a Plantelor, din Moscova, au descoperit că o cocultură a protoplaștilor de *Panax ginseng*, împreună cu sferoplaste derivate de la o linie a *A. rhizogenes* a reamorsat capacitatea culturilor celulare independente de chinetină – cu o vechime de 30 de ani de repicări repetate – de a diferenția și de a forma mase proembriogene, datorită acțiunii favorabile exercitate de aceste sferoparticule, asupra reactivării genelor responsabile de *embriogeneză* (*Herman*, 1997a). Dar, și în cazul coculturilor operate cu anumite tulpini de *A. tume-*

facians, de exemplu purtătoare ale genei β-glucuronidazei (GUS), în cazul vitroculturilor realizate cu explante caulinare de cartof, *Park* şi colaboratorii (1996) au observat că la nivelul calusului regenerat la baza acestora s-a realizat formarea de *lăstari*, care – în procent de 81%, în subcultură – au generat rădăcini; la fitoinoculii similari (lot de comparaţie), nesupuşi operaţiunilor de cocultură, rizogeneza a fost nulă, iar lăstarii neoformaţi s-au îngălbenit şi au murit, după numai o lună de vitrocultură (*Herman*, 1997a).

Bensalim şi colaboratorii (1998), experimentând cu explante de cartof, aflate în *cocultură* cu linia PsJN de *Pseudomonas* sp., au remarcat o creştere a rezistenţei vitroculturilor respective la un regim hipertermic de 33^0C ziua şi de 25^0C noaptea, aplicat atât *in vitro*, cât şi *ex vitro*, în decursul proceselor de tuberogeneză. *Bacterizarea* operată *in vitro* a determinat o stimulare semnificativă a creşterii în lungime a tulpinilor şi a biomasei vegetale (caulinare şi radiculare), acţiunea benefică a bacterizării traducându-se şi printr-o amplificare a tuberogenezei. Reacţiile au depins de genotip, în experiment urmărindu-se evoluţia a 36 de clone. Autorii citaţi au constatat şi faptul că, efectele favorabile odată instalate – în ceea ce priveşte producţia de tuberculi de cartofi de sămânţă – au putut fi regăsite în teren, ani de zile (*Herman*, 1998g).

Un experiment de *cocultură*, efectuat în scopul stimulării *rizogenezei*, a fost făcut de către *Damiano* şi *Monticelli* (1998), cu minibutaşi de măr, păr şi de prun, prin infectarea acestora cu tulpini de *A. rhizogenes*. Procedura a constat în scufundarea zonei bazale a minibutaşilor în suspensia de bacterii, după care ei au fost vitrocultivaţi pe medii de cultură, cu sau fără adaos de regulatori de creştere. Inocularea minibutaşilor cu *A. rhizogenes* a condus la o stimulare substanţială a rizogenezei, la nivelul bazei acestora. În urma experimentelor menţionate, autorii au ajuns la concluzia că, o parte dintre rădăcinile formate în astfel de condiţii au fost transgenice, ele conţinând gene derivate de la *A. rhizogenes* (*Herman*, 1999).

În ideea stimulării rizogenezei, la nivelul lăstarilor de *Sequoia sempervirens* cultivaţi *in vitro*, *Mihaljevic* şi colaboratorii (1999) au inoculat zona bazală a acestora cu tulpini sălbatice de *A. rhizogenes* şi au obţinut o *stimulare a rizogenezei* cu 69%, faţă de fenomenul similar urmărit şi înregistrat la lăstarii micropropagaţi prin tehnicile obişnuite, metoda dovedindu-se utilă în eficientizarea multiplicării *in vitro* a acestei specii (*Herman*, 1999 şi 2000a).

Tot o îmbunătăţire a randamentului în procesul de micropropagare la arbori, s-a înregistrat şi în cazul exprimării genelor *rol* provenite de la *A. rhizogenes*, bacteriile fiind cocultivate împreună cu explante de plop (*Tzfira* şi colab., 1999). Plantele de plop, regenerate în urma unor astfel de vitrocul-

turi, au manifestat o dezvoltare accelerată a lor atât în regim de *vitrocultură*, cât și după transferarea acestora *ex vitro*, realizându-se o anulare a dominanței apicale exercitată de mugurele terminal, concomitent cu aceasta, anihilându-se și ritmul sezonier de creștere a tulpinilor și a latenței de iarnă a lor, fenomene prezente la plantele de plop aclimatizate în condiții de seră. În plus, plantele respective au prezentat o îmbunătățire a caracteristicilor sistemului lor radicular, mai ales în primul an de viață, ceea ce a permis o mai rapidă dezvoltare a plantelor și o diminuare a lungimii internodiilor tulpinilor. Aceste fenomene morfofiziologice, în ansamblul lor, au favorizat creșterea plantelor, reprezentând un avantaj în decursul parcurgerii perioadei de aclimatizare a acestora, în momentul transferării lor *ex vitro* sistemul radicular al plantelor asigurându-le o mai bună aprovizionare a lor cu apă și cu săruri minerale (*Herman*, 2000a).

Infecțiile cu *A. rhizogenes* au fost utilizate ca un instrument util și în *stimularea* formării de *rădăcini adventive*, în decursul procesului de rizogeneză, la speciile lemnoase recalcitrante, din acest punct de vedere (*Caro* și colab., 2003), sau la neogeneza de rădăcini la nivelul plantulelor, în cazul înmulțirii lor vegetative, efectuate în perioade în care, fiziologic, din punct de vedere stadial, condițiile nu au fost optime. *Caro* și colaboratorii au realizat o înrădăcinare de 90 până la 100% a microbutașilor caulinari de *Prosopis chilensis* și de *Nothofagus alpina*, având dimensiuni de 1-2 cm, confecționați din segmente uninodale, prelevate de la plantule de 30 de zile, generate *in vitro* din semințe germinate în regim aseptic, pe medii de cultură suplimentate cu AIB (în cazul lui *P. chilensis*), sau în lipsa acestei auxine (în cazul lui *N. alpina*), în condițiile prezenței în mediile lor de vitrocultură (agarizat sau în prezența perlitei) a unei anumite tulpini de *A. rizogenes*; în lipsa acestei bacterizări, procentul de rizogeneză (la lotul control, pe medii cu AIB), în cazul lui *P. chilensis* a fost de circa 40%, și de 33% la microbutașii de *N. alpina*. Prin astfel de tratamente, s-a sporit nu numai numărul de rădăcinițe neoformate la baza *vitro* și exvitroplantulelor, ci și greutatea acestora. Autorii au subliniat însă că, rizogeneza – calitativ și cantitativ – respectiv masa radiculară neoformată la nivelul minibutașilor, a depins foarte mult de linia de *Agrobacterium* utilizată. Experimentele lor au mai relieefat și că, vitroculturile realizate în perlită, față de cele efectuate în mediu agarizat, sau pe un alt suport solid, au fost mai reușite (*Bapat* și *Ganapathi*, 2005).

În altă ordine de idei, în anul 2001 *Kalyaeva* și colaboratorii au semnalat efectul favorabil exercitat de către bacteriile aerobe, *metilotrofe* (*Methylovorus mays*), asupra *creșterii* și a *morfogenezei* desfășurate la nivelul vitroculturilor de tutun, de cartof și de in, aflate în regim de micropropagare.

Atunci când vitroculturile vegetale au fost inoculate cu tulpini de *M. mays*, aceste bacterii au format, cu țesuturile plantelor, *asociații* stabile. În procesul de micropropagare, în subcultură, în frunzele plantelor s-au identificat aproximativ $1\text{-}3\cdot10^3$ unități de colonii de bacterii, per cm^2, iar la plantulele de tutun și la cele de cartof, colonizate cu *M. mays*, în regimul menționat, s-a manifestat o creștere sporită a acestora; dacă din mediul de cultură au fost eliminate vitaminele, după o lună de vitrocultură numărul lăstarilor și cel al rădăcinilor – generate la nivelul minibutașilor – a crescut de 2-3 ori, ceea ce a făcut ca vitroplantulele respective să prezinte o dezvoltare mai rapidă. Totodată, s-a observat că explantele sau plantele colonizate cu metilotrofa *M. mays* au crescut normal, chiar și pe mediu lipsit de zaharoză, culoarea frunzulițelor și a lăstarilor fiind de un verde intens. Acest fapt, i-a determinat pe autori să considere că, metilbacteria analizată a favorizat nu numai dezvoltarea cloroplastelor, ci a intensificat și activitatea acestora (*Herman*, 2001).

Ulterior, *Koopmann* și *Kutschera* (2005) au inoculat, cu suspensii de *Methylobacterium* (care aveau o densitate a unităților coloniale de bacterii de 10^4), fragmente apicale, prelevate de la hipocotile de floarea-soarelui, provenite de la plantule etiolate, având patru zile de germinație. Durata de submersare a explantelor în suspensia microbiană a fost de 30 de minute. În vitrocultură, la nivelul inoculilor de acest tip, infestați cu bacterii *metilotrofe*, atât caulogeneza, cât și rizogeneza au fost semnificativ sporite. Autorii au sugerat că, în urma *cocultivării* fragmentelor de hipocotile cu celule bacteriene de *Methylobacterium*, în celulele fitoinoculilor s-a produs o sporire a sintezei de fitohormoni. În plus, s-a apreciat și faptul că, pe lângă fitohormoni, *asociația* formată a produs și unele substanțe de creștere, încă necunoscute (*Herman*, 2005b și c).

Tot în legătură cu cercetările de cocultură, efectuate cu linii de *Methylobacterium*, trebuie menționate și studiile întreprinse de către *Maliti* și *Basile*, de la City University din New York, și *Corpe*, de la Columbia University (2005), pe calus de orez. Cercetările menționate se referă la obținerea unei semnificative creșteri a calusului și a rizogenezei în vitroculturile contaminate cu o anumită bacterie metilotrofic facultativă, care produce, la interfața dintre fitoinoculi și substratul de cultură, o infecție de culoare roz (*Herman*, 2005c).

Autorii anterior menționați au izolat, de pe frunzele de trifoi, și o altă tulpină de *Methylobacterium*. Efectuând studii comparative, pe vitroculturi de orez, în lipsa regulatorilor de creștere din mediul de cultură, la fitoinoculii infectați cu tulpina amintită, ei au remarcat o sporire semnificativă a

rizogenezei, a taliei tulpinilor și a rădăcinilor, precum și a biomasei totale, măsurată după nouă zile de vitrocultură (*Herman*, 2006b).

Nhut (2005), în urma efectuării unor experimente de *cocultură*, a semnalat faptul că, infectarea vitroculturilor de crizanteme cu tulpini de *Bacillus sp.* a stimulat creșterea plantulelor regenerate din fragmentele caulinare, care au deținut în structura lor mugurele apical. *Cocultura* a durat patru săptămâni; după patru săptămâni de creșterea în seră a exvitroplantulelor provenite dintr-o astfel de cocultură, plantele rezultate din culturile infestate cu *Bacillus* au prezentat o talie mai mare, un număr mai ridicat de rădăcinițe, o greutate proaspătă sporită, un procent mai crescut de supraviețuire a acestora, postaclimatizare, precum și o limitare a instalării în mediul din preajma vitroculturilor a altor microorganisme concurente sau fitopatogene etc. (*Herman*, 2005e).

Dar, după cum am mai prezentat (1.2.2.1.2.), prin intermediul coculturilor realizate între fitoinoculi și variate biotipuri de *Agrobacterium*, prin mijlocirea transformărilor transgenice mediate de vectorii lor plasmidali, s-au putut obține și *fenotipuri rezistente* la anumite erbicide (atrazinice, la glicofosfat, sulfoniluree, bromoxynil, fosfoinotricin etc.), mai ales la tutun, cartof și la tomate. Tot prin tehnici de inginerie genetică, *Agrobacterium* a servit și la obținerea de plante transgenice, care au dovedit o rezistență sporită la insecte și la virusuri, dar și o toleranță la prezența în sol a unor metale grele, sau de plante care au deținut o capacitate mai mare de păstrare a fructelor (mai ales de tomate), în condiții de transport (la manipulare în procesul de comercializare), ș.a.m.d. Marea majoritate a acestor proceduri au avut succes nu numai la tomate, cartof, tutun, ci și la lucernă. Dar, nu în toate cazurile o cocultură a fitoinoculilor cu tulpini de *A. tumefaciens* a dus la stimularea diferențierii celulare și la regenerarea de muguraşi, din plantele modificate genetic, obținute pe această cale. Reacția fitoinoculilor a depins de specia de plantă cu care s-a lucrat, de natura explantelor și de tulpina de *Agrobacterium* selectată în acest scop. După cum preciza *Delis* și colaboratotrii (2005), la ardei (*Caspicum anncium* L.), organogeneza – la nivelul fitoinoculilor – este greu de realizat. În lucrarea lor, ei au adus precizări cu privire la faptul că, cu rare excepții – cum a fost cazul la ardeiul dulce și la cel iute (*Zhu* și colab., 1996; *Manoharan* și colab., 1998; *Lim* și colab., 1999; *Lee* și colab., 2004) – din coculturi practicate cu *A. tumefaciens* s-a realizat regenerarea de plante transformate genetic. De cele mai multe ori, cercetătorii au remarcat că regenerarea de muguraşi, la nivelul explantelor constând din cotiledoane sau din hipocotile, a fost anormală, aceştia nedând naştere la lăstari tipici, caracteristici (*Valera-Montero* și *Ochoa-Alejo*, 1992; *Hyde* și *Philips*, 1996).

Transformarea genetică intermediată de *A. tumefaciens*, practicată pe fitoinoculi, a servit însă, şi serveşte, şi la obţinerea de plante transgenice producătoare de *vaccinuri orale*, pentru om şi animale (procedurile utilizate în tehnicile de inginerie genetică, mediate de *Agrobacterium*, sunt complexe; ele vor fi detaliate de noi într-un viitor volum al *Tratatului de biotehnologie vegetală*). Important este de reţinut faptul că, vaccinarea subiecţilor umani sau animali se face prin ingerarea organelor comestibile ale plantelor care deţin – în urma modificărilor operate în genomul acestora – proteine antigen, specifice. În imunizarea de acest tip, consumarea biomasei vegetale se face în stare proaspătă.

În anul 1995, *McGarvey* şi colaboratorii (de la Universitatea Jefferson din SUA), au realizat un *vaccin oral* împotriva virusului turbării, prin transformări mediate de *A. tumefaciens*, în vitroculturile de tomate; tomatele transgenice regenerate din cotiledoane transformate de *A. tumefaciens*, precum şi din alte culturi de ţesuturi, au conţinut proteina G (expresie a genei pentru glicoproteină) care învelește virusul rabiei, linia ERA. Această proteină imunizantă, conţinută atât în fructele, cât şi în frunzele de tomate, elicitează o protecţie imunitară a animalelor împotriva virusului turbării, linia ERA (*Herman* 1996b şi d).

Un *vaccin oral*, care crează autoimunitate la om, a fost obţinut în anul 1997 la cartof, de către un colectiv de cercetători de la Universitatea Loma Linda din SUA, condus de către *Arakawa*. În experimentele lor, cercetătorii au utilizat tulpini de *A tumefaciens*, în scopul transferării unei gene modificate, codificată cu o subunitate proteică CTB („*cholera toxin B*" – provenită dintr-o suşe de vibrion holeric, netoxic), ce poate induce producerea de anticorpi la om şi la animale, şi care acţionează eficient şi în determinarea formării de alţi antigeni. Aceste cercetări au deschis calea dezvoltării tehnicilor de producere a plantelor utilizabile ca alimente, cu calitatea de a asigura o vaccinare orală a oamenilor şi a animalelor contra holerei sau a altor boli (*Herman*, 1998a).

Cercetările menţionate deschid un larg capitol în domeniul producerii, pe căi biotehnologice, în bioreactoare, de *vaccinuri orale*, folosind ca agent biologic celule, ţesuturi, sau organe vegetale vitrocultivate, provenite din plante transgenice, obţinute prin modificări realizate prin operaţiuni de inginerie genetică, mediate de tulpini de *Agrobacterium* (*Curtis* şi *Cardineau*; după *Herman*, 1998g).

Bhattacharya şi *Bhattacharya* (2004) au descoperit că un extract proaspăt, preparat din „rădăcini firoase" de *Phyllanthus amarus* (plantă utilizată ca remediu naturist împotriva hepatitei B), obţinute prin transformare genetică operată prin intermediul lui *A. rhizogenes*, a prezentat – într-un

procent de 85% – o sporire a capacității de inhibare a virusului HbsAg („hepatits B virus surface antigen"), în raport cu extractul proaspăt preparat din rădăcinile martor de *P. amaras*, nemodificate genetic, plante la care această activitate represivă a fost de doar 15% (*Herman*, 2005a).

În regim de cocultură cu fitoinoculi, *Agrobacterium rhizogenes* a servit, adeseori, ca *model* experimental, ori ca agent biologic, în cercetările care au avut ca obiectiv studierea modului în care genele externe genomului examinat pot *controla unele sinteze în metabolismul secundar* al plantelor. Astfel, *Bonhomme* și colaboratorii (1999) au analizat, comparativ, la *Atropa beladonna*, producția de alcaloizi tropanici, în culturi de rădăcini firoase („hairy-root"), care au conținut cele trei gene specifice ce transformă rădăcinile normale în rădăcini firoase, respectiv genele *rol A*, *rol B* și *rol C*, și în culturi în care rădăcinile au conținut doar gena *rol C*. Ei și-au comunicat rezultatele lor la un simpozion organizat, în anul 1999, în Franța, la Nancy, manifestare intitulată „*Les Biotechnologies Végétales a l'Aube du XXI*^{eme} *Siècle*". Prin expermentele lor, autorii au dovedit că gena *rol C*, singură, este capabilă să inducă producerea – la un nivel înalt – de alcaloizi tropanici, în special de hiosciamină și de scopolamină (*Herman* 2000c).

Succese notabile în direcția stimulării sintezei de *izoflavone* (genisteină și daidzeină, compuși cu efecte favorabile în tratarea bolilor de inimă, a cancerului, a diabetului și care pot mima acțiunea farmacologică a estrogenilor) au fost obținute de către un colectiv de cercetători din Coreea (*Park* și colab., 2006), prin cocultivarea *in vitro* a rădăcinilor de *Albizzia kalkora* (o importantă specie medicinală lemnoasă, care trăiește în țări asiatice, cum sunt: Coreea, China și India), cu tulpini de *Rhizobium radiobacter* sau de *R. rhizogenes* (*Agrobacterium rhizogenes*). Prin *bacterizarea* cu *R. rhizogenes*, în celulele radiculare a crescut cu 35% producția de daidzeină și cu 94% cea de genisteină, în comparație cu cantitatea de izoflavone de acest tip, menționate ca fiind realizată în vitroculturile de rădăcini de *A. kalkora*, nebacterizate. *Bacterizarea* cu *R. radiobacter* a condus la ridicarea producției de daidzeină la doar 10-12%, iar aceea de genisteină la 89% (după *Herman*, 2007a). De altfel, *Rhizobium* a fost utilizat și de către japonezii *Shitan* și colaboratorii (2005), pentru modificarea genetică a plantei *Copis japonica*, importantă specie medicinală, transformarea genetică fiind făcută printr-o cocultură a explantelor de tip pețiol cu tulpini de *R. radiobacter*, în loc de *Agrobacterium*; calusul format din astfel de explante a regenerat plantule, care în procent de 46% au fost transformate favorabil, din punct de vedere genetic (după *Herman* 2005f).

Dar, în experimentele de cocultivare *in vitro* a celulelor umane, cu tulpini de *Agrobacterium*, *Citovsky* și colaboratorii (2001) – de la Universi-

tatea de stat din New York – au constatat că această bacterie a fost capabilă să se atașeze și să-și insereze ADN-ul său celulelor umane, exact așa cum acest proces se petrece în cazul celulelor vegetale. Această descoperire ridică semne de întrebare în ceea ce privește măsura în care *Agrobacterium* reprezintă un potențial pericol pentru om și animale, cel puțin în ceea ce privește tulpinile naturale ale acestei bacterii (www.bitech-info.net/tumor-causing.html).

Transformările genetice intermediate de coculturile dintre tulpinile de *A. rhizogenes* și fitoinoculi, pot da naștere la vitroculturi cu capacități bioproductive de excepție, cum sunt cele constând din rădăcini firoase („hair roots"), ce se constituie în noi surse de produși secundari de metabolism (*Bapat* și *Ganapathi*, 2005).

Evident că, în operațiunile de inginerie genetică, tulpinile de *A. rhizogenes* servesc și la *vehicularea de gene* în sistemul radicular al plantelor, prin aceasta urmărindu-se obținerea de transformări benefice care, ulterior, să conducă la selectarea de plante care, în întregimea lor, sau numai sistemul radicular al acestora, să posede o rezistență sporită fie la agenți patogeni, fie la pesticide, fie la metalele grele prezente în sol. Alte cercetări au fost axate pe obținerea de infecții stabile cu rizobii, sau de gene fixatoare de azot (*Bapat* și *Ganapathi*, 2005).

Cercetări efectuate în anii 2006-2007 continuă să aducă noi elemente cu privire la infecțiile provocate la nivelul fitoinoculilor de bacteriile latente – „ancorate" sau aderente suprafeței explantelor vegetale, sau depistate mai ales în mediile de cultură agarizate – în condițiile micropropagării elitelor, în circuit închis, timp de mai mulți ani, ori în cazul clonării genotipurilor de interes economic sau științific, a fitoinoculilor constituiți în stocurile de germoplasmă, de proveniență variată, precum și a celor de natură endofită. De exemplu, *Hamili* și colaboratorii (2005) au prezentat o lucrare amplă, și complexă, cu privire la rolul jucat de bacteriile *endogene* prezente în explante și problemele pe care le ridică acestea în influențarea potențialului biologic al vitroculturilor de banan, culturile fiind inițiate din meristeme caulinare mai mici de 1 mm. La astfel de culturi de meristeme se întâmpină greutăți în obținerea de vitroculturi potente din cauza contaminării acestora cu o multitudine de microorganisme, cum ar fi specii de: *Klebsiella*, *Herbaspirillium*, *Agrobacterium*, *Paenibacillus*, precum și cu unele *Enterobacteriaceae*. Dintre acestea, 8,8% au fost izolate din culturile de inițiere, folosind explantele meristematice, unele microorganisme fiind *endofite*, iar 39,6% dintre ele fiind o consecință a operațiunilor de subcultivare. La început, descreșterea vigurozității și a capacității de multiplicare a culturilor a fost datorată asocierii inoculilor meristematici cu bacterii contaminante, la-

tente; cu excepția lui *Agrobacterium*, *Paenibacillus polymyxa* a stimulat creșterea meristemelor și a inhibat dezvoltarea fungilor patogeni, *Klebsiella* sp., a facilitat o creștere a greutății fitoinoculilor regenerați din meristeme, iar infecțiile cu bacterii de tip *Herbaspirillium*, au stimulat creșterea mai rapidă a inoculilor vegetali. Deci, acest tip de culturi asociate au exercitat efecte benefice asupra fitoinoculilor, plantulele regenerate din astfel de coculturi s-au dovedit a fi mai rezistente la stres. În consecință, autorii menționați anterior au recomandat inocularea culturilor de țesuturi sau de vitroplantule de banani, cu linii bacteriene endofite – izolate din țesuturile meristematice – care s-au dovedit a exercita efecte benefice asupra vitroculturilor, îmbunătățind semnificativ productivitatea plantelor rezultate din astfel de culturi (*Herman*, 2006d).

Jagadeesh și colaboratorii (2006) au efectuat experimente cu plantule de tomate, provenite din germinarea *in vitro* a semințelor, infectate cu două linii de *Bacillus*, bacterii care au influențat negativ nu numai încolțirea semințelor și dezvoltarea plantulelor, ci și creșterea rădăcinilor, ce a fost inhibată cu 37-48%. Dacă vitrocultura a fost realizată în regim *vitropatic*, în condițiile în care în flacoane au fost prezente și linii ale rizobacteriei *Pseudomonas*, efectul inhibitor exercitat de *Bacillus* a fost eliminat, iar creșterea în lungime a rădăcinilor – în comparație cu talia acestora marcată la lotul de plantule martor – a fost stimulată cu 29% (*Herman*, 2007e).

Larraburu și colaboratorii (2007), de la Universitatea Națională din Luján, Argentina, au constatat că rizobacteria *Azospirillum brasiliense* a stimulat micropropagarea *in vitro* la *Photinia* (plantă arbustiformă), atunci când lăstarii tratați timp de 6 zile cu soluție de AIB, în concentrație de 4,9 μM, au fost transferați într-un mediu de cultură liber de auxine, dar inoculat cu *A. brasiliense*. Această procedură a determinat o înrădăcinare mai rapidă a lăstarilor (comparativ cu culturile similare nesupuse unui astfel de tratament), fiind sporită cu 65% suprafața radiculară, cu 32% greutatea proaspătă a tulpinilor și cu 62% greutatea uscată a acestora (*Herman*, 2007d).

Tot cercetări recente, efectuate de către pakistanezii *Ali* și *Hasnain* (2007), au pus în evidență faptul că, o auxină de origine bacteriană – elaborată de bacteria *Halomonas desiderata* – a exercitat asupra explantelor internodale de *Brassica oleracea* un efect similar cu acela produs de auxinele naturale sau de cele sintetice; în prezența unui extract de nucă de cocos 10%, adaosul de 50 sau 10 μl supernatant, separat din mediul de cultură al bacteriei și introdus în mediul de cultură *Murashige-Skoog* pe care au fost inoculate și cultivate explantele de *Brassica*, a stimulat cu 75% regenerarea de lăstari (*Herman*, 2007d).

Cercetări de ultimă oră, publicate de către *Thomas* în anul 2007, în revista *Current Science* (după *Herman*, 2007c), au relevat faptul că, în biotehnologie, alcoolul etilic poate constitui o sursă de contaminare, întrucât din etanol au fost izolate cinci clone bacteriene care au fost identificate ca fiind prezente – ca germeni latenți, remanenți – în subculturile de pepeni verzi (*Citrullus lanatus*), practicate *in vitro*, timp îndelungat. Unele bacterii trăiesc atât în soluția de etanol 70% (utilizată în mod comun în sterilizarea materialului vegetal și a suprafețelor obiectelor introduse în perimetrul steril), cât și în alcoolul etilic, absolut. Dintre bacteriile aerobe și Gram-pozitive, care au fost identificate în alcoolul etilic, menționăm: *Bacillus fusiformis*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, și *B. flexus*. De altfel, rezistente la alcool etilic absolut, sau la etanol 70% sunt și *B. thuringiensis*, precum și unele specii de *Brevibacillus* (*Herman*, 2007c).

Dacă există numeroase studii care au demonstrat efectele benefice ale cocultivării unor bacterii împreună cu variați fitoinoculi (*bacterizare*), există puține lucrări referitoare la succesele obținute prin *biotic elicitare*, respectiv creșterea producției de compuși secundari de metabolism prin cocultivarea unor bacterii împreună cu țesuturi sau celule vegetale.

Park și colaboratorii (2007), cocultivând rădăcini de *Albizzia kalkora* împreună cu *Agrobacterium*, au reușit să stimuleze producerea de isoflavonoide, în biomasa vegetală produsă în astfel de condiții (*Herman*, 2009).

Wua și colaboratorii (2008) și *Kang* și colaboratorii (2009) au fost de părere că, prin procedurile de cocultură – realizate între fitoinoculi și anumite bacterii vii – se reușește o sporire a producției de metaboliți secundari, chiar dacă creșterea inoculilor vegetali a fost într-o oarecare măsură stânjenită. Astfel, în condițiile cocultivării suspensiilor celulare de *Ginkgo biloba*, derivate din embrioni zigotici, cu celule de *Candida albicans* sau cu cele de *Staphylococcus aurens*, în biomasa de *Ginkgo* s-a înregistrat o acumulare de bilobalid și de ginkgolide (*Kang* și colab., 2009). Încă după primele 24 ore de cocultură, producția celor două tipuri de ginkgolide – A și B – a crescut de 2,5 ori. Dificultatea constă în găsirea duratei optime de expunere a suspensiilor celulare de *Ginkgo* la acest regim de cocultură, respectiv la acțiunea „elicitorilor biotici".

Studii teoretice interesante, în legătură cu aspectele citologice și enzimatice care privesc interacționarea celulelor vegetale cu bacteriile, mai ales de tipul lui *Agrobacterium*, au fost făcute și în țara noastră, de către un colectiv mixt de cercetători de la Institutul de Biologie din București, precum și de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din capitală (*Maximilian* și colab., 2004). În urma cercetărilor efectuate de *Maximilian* și colaboratorii, a rezultat că în interrelațiile stabilite între celula

vegetală (de exemplu de viță-de-vie) și celula bacteriană (*A. rhizogenes*), un rol major îl joacă – într-o primă fază – factorul de „aderare" al celulelor bacteriene la nivelul celor ale fitoinoculilor, accesarea fiind făcută de *microfibrilele exopolizaharidice* de tip celulozic, de origine microbiană. Pe plan secund, după cum se preciza în articol, nu poate fi exclusă nici participarea directă a peretelui celular, vegetal, la nivelul căruia se realizează o distribuție mai mult sau mai puțin uniformă a receptorilor specifici. Totodată, la vitroculturile de viță-de-vie infectate cu tulpini de *A. rhizogenes*, s-a constatat o scădere a numărului de izoesteraze, ca urmare a intervenției în plan metabolic a opinelor sintetizate de celulele vegetale gazde, ca o consecință a infecției produse de către celulele bacteriene.

1.4.1.3.3. Cocultivarea fitoinoculilor cu *fungi fitopatogeni* sau *fitosaprofiți*

După *Gautheret* (1959), o serie de fitoparaziți (obligați sau facultativi patogeni), cum este rugina viței-de-vie (sau infecțiile cu uredinale), sunt dificil sau imposibil de crescut artificial, pe medii de cultură; în schimb, fitoparaziții, asociați fiind – în vitrocultură – cu țesuturi vegetale, gazde naturale ale acestor organisme (așa cum este cazul ruginii viței-de-vie, cocultivată cu calus de *Vitis*), patogenul reușește să supraviețuiască (*Morel*, 1948).

În studierea reacției gazdelor vegetale la bolile *micotice* (*micoparazitozele*, experimente care au fost întreprinse pe modele constând din culturi de celule și țesuturi), o preocupare de bază a constituit-o obținerea și menținerea în viață a unor vitroculturi *monoxenice*. Pentru aceasta, în organizarea experimentelor de inițiere a unor vitroculturi vegetale monoxenice, infectate doar cu un *fung* obligat fitopatogen, s-a pornit de la trei variante de lucru, și anume: 1. infectarea cu fung a unui țesut calusal, vitrocultivat; 2. cultivarea *in vitro* a unor țesuturi vegetale deja infectate, și 3. inițierea de vitroculturi din formațiuni specializate, generate în plantele gazde, ca rezultat al producerii de infecții fungice create artificial (*Braun* și *Lipetz*, 1966).

Dar, atunci când se procedează la infectarea fitoinoculilor cu sporangi ori cu conidii, sau cu variate categorii de spori, odată cu „instalarea" lor în vitrocultură, inerent, în acestea se vor produce și contaminări nedorite, cu variate bacterii banale, ele nefiind aseptice; astfel, sporii pot provoaca o compromitere a coculturilor, din cauza prezenței în sistem a unor agenți *saprofiți* care, ulterior, vor invada mediul și culturile tisulare, concurând și sufocând fitoinoculii. Microorganismele „concurente" (de regulă *saprofite*), prezente în vitrocultură, cauzează nu numai o invadare a fitoinoculilor, ci și o modificare a compoziției chimice și a proprietăților substratului pe care inoculii cormofitici se află amplasați. De aceea, atunci când se efectuează

astfel de studii, trebuie să se opereze cu culturi pure de ciuperci, pregătite în prealabil prin efectuare de repetate repicări practicate în cascadă, la fiecare subcultivare a fungului fiind necesară verificarea lipsei din mediu a altor microorganisme.

Atât în cazul *bacteriilor fitopatogene* sau *saprofite*, cât şi în cel al *fungilor*, odată cu iniţierea culturilor axenice, o coabitare a acestora cu fitoinoculii este nedorită, motiv pentru care condiţia de bază în reuşita vitroculturilor vegetale este respectarea regimului aseptic, începând de la sterilizarea suprafeţei materialului vegetal cu care se demarează cultura primară, cât şi a mediilor şi recipientelor în care sunt efectuate vitroculturile, a instrumentelor cu care se operează inocularea, a aerului din incinta sterilă, a mâinilor lucrătorilor etc. (*Cachiţă* şi colab. 2004).

După cum se va vedea în subcapitolul 1.4.1.4., *microflora simbiontă* (*microbiană* sau *fungică*) intră în cu totul altă problematică, fiind vorba de infecţii controlate, efectuate cu tulpini selectate, care exercită o acţiune favorabilă asupra vitro- şi exvitroplantulelor.

Cercetări de dată recentă (*Bisaria* şi colab., 2008) au dovedit că o cocultură realizată între celule de *Linum album* şi un *fung micorizal* a permis evidenţierea – pentru prima dată – a faptului că, fungii *Piriformospora indica* şi *Sebacina vermifera* (proveniţi din culturi pure) au interacţionat cu celulele de in, de maniera în care acestea au elicitat sporirea de şase ori a cantităţii de podofilotoxină şi de opt ori a celei de 6-metoxipodofilotoxină, precursori utilizaţi în producerea unor medicamente anticanceroase, după numai 12 zile de cocultură. Aceste cercetări deschid calea stimulării producţiei de compuşi secundari de metabolism, prin elicitarea acestor biosinteze prin intermediul fungilor micorizali, arbusculari (*Herman*, 2008a).

1.4.1.3.4. Implicarea vitroculturilor vegetale în studierea stării *canceroase* în celulele plantelor

În literatura de specialitate, la plante conceptul de *cancer* – sau cel de celulă *canceroasă* – este încă în mică măsură definit clar (*Gaspar*, 1995).

Din cele prezentate de noi anterior, a reieşit faptul că la *cancerul* vegetal inducerea formării *tumorilor* de către unii agenţi fitopatogeni este pusă în legătură, în principal, cu infecţiile *virale* sau cu cele *bacteriene* (*Braun*, 1978; *Bednar* şi *Linsmaier-Bednar*, 1989). Dar, după cum am mai menţionat în subcapitolele anterioare, la plante există şi *cancere* neprovocate de agenţii patogeni, cum sunt cele de origine genetică şi cele de tip funcţional (de natură fiziologică), consecinţă a producerii în celule a unor dezordini metabolice.

Gautheret (1959) a fost de părere că, uneori, o transformare de tip *canceros*, petrecută la nivelul celulelor vegetale aflate în vitrocultură, poate să se producă spontan, sub forma fenomenelor de *habituație* (termen sinonim cu cel de *anergism*), noțiune prin care se subînțelege o lipsă de reacție a fitoinoculilor, în raport cu un anumit compus prezent în mediul lor de cultură, manifestare concretizată, de exemplu, prin absența unui răspuns al unor astfel de celule la existența în substrat a *auxinei*. Un asemenea comportament este întâlnit mai ales în cazul unor tipuri de vitroculturi efectuate cu țesuturi *tumorale*, situație care pare să fie datorată producerii în celulele acestor fitoinoculi a unor transformări de tip *neoplazic*, ele devenind auxin-autonome.

O altă formă de *cancerizare* a celulelor vegetale vitrocultivate este tot de natură fiziologică, identificată în fitoinoculii *hiperhidrici**, supranumiți și *vitrificați*.

Din cele arătate, se subînțelege că în vitroculturile vegetale, neoplazmul celular nu se exteriorizează întotdeauna prin tumorogeneză, dar „dezordinea" endocelulară provocată de procesul de *cancerizare* este o dovadă a transformărilor *oncogenice*, care au avut loc la nivelul acestora, multe dintre ele fiind posibil de surprins mai ales pe plan ultrastructural și biochimic, și doar în fazele avansate sunt sesizabile manifestări de ordin macroscopic, atunci când unele reacții – de natură morfoanatomică – pot fi vizibile deja și cu ochiul liber.

Țesuturile *tumorale* de origine *genetică* au suscitat interesul cultivatorilor de țesuturi vegetale, încă din epoca de pionierat a fitovitrotehnicilor, hipertrofiile tisulare de acest tip fiind studiate de către cercetătorii anilor '30 ai secolului XX (*Kostoff*, 1930, *Whitaker*, 1934, *White*, 1937, și alții). Cele mai comune și mai cunoscute tumori, vizibile cu ochiul liber, sunt cele de origine *genetică*, care se produc spontan la nivelul tulpinilor hibridului rezultat în urma încrucișării speciilor *Nicotiana glauca* cu *N. Langsdorffii*, precum și cele generate prin infecții cu *Agrobacterium*.

* Întrucât *vitrificarea* (sau *sticlozitatea*) este un termen utilizat și în cazul tehnicilor de crioconservare, noțiunea semnificând o înghețare instantanee a țesuturilor vii, prin imersarea acestora în azot lichid, în literatura de specialitate, de biotehnologie vegetală (mai ales din ultimul deceniu), termenul de *vitrificare* – care semnifica un fenomen de transparentizare spontană a țesuturilor și organelor vitroculturilor vegetale menținute în regim termic pozitiv – a fost înlocuit cu cel de *hiperhidrie*, întrucât formațiunile vegetale afectate de acest proces (frunze, tulpini, calus etc.) prezintă, în principal, pe lângă o hiperplazie și un conținut sporit de apă.

Tumorile de natură genetică, prezente la nivelul tulpinilor hibride de *Nicotiana*, apar spontan – într-o zonă care a suferit o leziune – remarcându-se generarea unui proces proliferativ, anarhic, şi dezvoltarea în acea regiune a unor malformaţii voluminoase, de natură neoplazică. Fenomenul a intrat în atenţia lui *White*, încă din anul 1937, savantul studiind acest proces timp de mai mulţi ani, publicându-şi rezultatele experimentelor între anii 1939(a şi b) şi 1944. Mediul de cultură utilizat de către *White*, în experimentele cu ţesuturi tumorale, nu a conţinut auxină, în schimb a deţinut vitamina B_1 şi glicocol. În raport cu celulele ţesuturilor normale, celulele acestor tipuri de *tumori* – cu caracter *neoplazic* – au manifestat cerinţe nutritive modeste faţă de compoziţia chimică a mediului de cultură pe care ele au trebuit să fie vitrocultivate. Se consideră că acest tip de ţesut *tumoral* a fost primul care a putut fi cultivat continuu, pe un mediu mineral simplu (*White*, 1939a şi b). Atunci când acest ţesut a fost cultivat pe mediu agarizat, el a generat calus şi nu a diferenţiat morfostructuri; dacă mediul de cultură a fost lichid, la nivelul inoculilor imersaţi în substratul nutritiv lichid s-au declanşat procese de organogeneză, din calus regenerându-se tulpinişe şi frunzuliţe. Faptul a fost interpretat, de către *White*, ca fiind datorat – în cazul regimului de submersie în care s-au aflat vitrocultivate ţesuturile *tumorale* – existenţei în mediul de cultură a unui gradient mai scăzut de oxigen, în raport cu acela prezent în atmosfera din recipientele de cultură, condiţie care a influenţat favorabil declanşarea proceselor de diferenţiere (*White*,1939b), la nivelul calusului de origine tumorală.

Skoog (1944), analizând experimentele lui *White*, a constatat că imersarea calusurilor într-un mediu lichid de cultură s-a făcut abia după practicarea a 144 de pasări (subcultivări) ale vitroculturilor *tumorale* pe un mediu agarizat, cu adaos de AIA în concentraţie de 0,2 mg/l. Dacă pe mediu agarizat, prezenţa AIA a inhibat diferenţierea ţesutului tumoral vitrocultivat, în mediul lichid auxina a stimulat creşterea calusului şi organogeneza la nivelul acestuia, marcându-se, totodată, şi o sporire cu 50% a biomasei rezultată în final.

Fenomenul de *anergism* (respectiv *habituaţia*) a fost observat şi descris de către *Gautheret*, încă din anul 1942. El a semnalat prezenţa acestui proces la culturile vegetale aflate de mai mult timp (luni sau ani) în regim de vitrocultură. Fitoinoculii afectaţi de anergism, altă dată sensibili la acţiunea benefică a *auxinei*, la un moment dat îşi pierd această dependenţă, fenomenul de „independenţă" faţă de auxină instalându-se treptat. Acestă reacţie de autonomie auxinică, manifestată de ţesuturile vegetale habituate, se aseamănă, aparent, cu lipsa cerinţei celulelor de tip *crown-gall* faţă de acest fitohormon. Amplitudinea acestei reacţii depinde de specia vegetală vitrocultivată,

dar și de natura și concentrația regulatorilor de creștere prezenți în mediile de cultură, fapt care l-a condus pe autor (în anul 1946a), la formularea concluziei potrivit căreia celulele care nu mai manifestă cerințe în raport cu *auxina* au suferit transformări *tumorale*. Dar, experimentele de *grefare* a țesuturilor *anergice*, sau a celor prelevate din tumori de tip *crown-gall*, în țesuturi sănătoase, au relevat faptul că celulele de *crown-gall*, vitrocultivate, și-au continuat proliferarea exuberantă, în timp ce celulele țesuturilor *anergice* au manifestat o reacție proliferativă mai moderată (*Camus* și *Gautheret*, 1948 a și b; *Braun* și *Morel*, 1950).

Întrucât, unele tipuri de celule tumorale produc o mare cantitate de *amilază*, *Nickell* și *Brakke* (1954) și *Brakke* și *Nickell* (1951; 1955) au recomandat vitrocultivarea acestora pe medii solidificate cu amidon, polizaharid utilizat, în această situație, și ca sursă energetică de carbon, în loc de zaharoză.

În schimb, în alte cazuri, experimentele întreprinse cu vitroculturi de tutun au relevat că țesuturile *anergice* și cele de *crown-gall*, *grefate* pe tulpini sănătoase, au generat – într-o manieră asemănătoare (ca amploare, structură și consistență) – formarea de *tumori* (*Gautheret*, 1959).

White (1951) a făcut și primele încercări (din păcate nereușite) de cultivare *in vitro* a țesuturilor tumorale, prelevate din *galele* de *Querqus*, de *Rubus* și de *Solidago*, produse de *zoocecide*.

Ulterior, *Démétriadès* (1953) a inițiat o vitrocultură de țesut proliferativ prelevat din *gale* de *Salvia pomifera* (tumori produse de larva himenopterei *Aulax*), în condițiile prezenței *auxinei* în mediul de cultură. El a introdus auxina în compoziția mediului de cultură, cu toate că, la acea dată se cunoștea faptul că țesutul de *crown-gall*, și cel ce conține celule *anergice* la *auxine*, în vitrocultură nu necesită prezența în substrat a unui astfel de fitohormon. Cu toate acestea, autorul a ajuns la concluzia că, țesutul prelevat din *gale* nu a prezentat un comportament de tip *neoplazic*. Aceste celule – cultivate fiind *in vitro* – au manifestat cerințe asemănătoare cu cele normale, în ceea ce privește compoziția mediilor de cultură, respectiv ele necesitând în substratul aseptic prezența regulatorilor de creștere. În schimb, *Boysen-Jensen* (1952), *Anders* (1958) și *Lewis* și *Walton* (1958), prin experimentele lor au demonstrat că larvele de himenoptere, prezente în interiorul *galelor*, secretă continuu, în țesuturile foliare, substanțe cu efecte stimulatoare asupra proliferării și creșterii celulelor vegetale, compușii sintetizați de acestea fiind eliberați în exteriorul corpului lor. Acest fapt a fost dovedit de către cercetători, prin reacțiile surprinse la nivelul fitoinoculilor constând din țesuturi prelevate din *gale*, în condițiile suplimentării mediului lor de vitrocultură cu extracte preparate din larvele insectelor respective. De altfel, în

natură, dacă larvele insectelor mor prematur, creşterea *galelor* – respectiv proliferarea celulelor frunzelor gazde – este stopată.

În general, atunci când *galele* cresc, diferenţierea celulelor parenchimului care le alcătuiesc este slabă (*Braun* şi *Lipetz*, 1966). Aceste cercetări au permis evidenţierea dependenţei formării *galelor* (care la o anumită specie de insecte au mărime, polaritate şi simetrie constantă), în locurile în care s-a produs atacul insectelor, de manifestarea proceselor de dediferenţiere celulară şi de reinstalarea fenomenelor de multiplicare la nivelul acestora, etapă urmată, ulterior, de o rediferenţiere a celulelor nou formate. Aceste procese se petrec sub directa acţiune a substanţelor de creştere produse de către insecte, compuşi care, în acea zonă iniţiază, stimulează şi orientează proliferarea şi diferenţierea celulară.

Nickell şi colaboratorii (1950), experimentând cu explante vitrocultivate, de ţesut *tumoral*, de origine *virală*, au constatat o stimulare a creşterii acestor fitoinoculi, în condiţiile introducerii în mediul de cultură al acestora a unor compuşi, cum sunt: hidrolizatul de acid ribonucleic, uracilul, guanina, xantina sau hipoxantina. În schimb, adăugarea în mediul de cultură a unui hidrolizat de ADN a exercitat efecte negative asupra creşterii ţesutului *tumoral*, acest produs inhibând proliferarea celulară, la nivelul inoculilor neoplazici.

Tot *Nickell* (1949; 1955), singur sau împreună cu *Burkholder* (1949), investigând în regim de vitrocultură evoluţia *in vitro* a explantelor vegetale, tisulare, prelevate din *tumori* de natură virală, a constatat că pentru a se obţine o creştere normală a celulelor de natură tumorală a fost necesară o sporire de opt ori a concentraţiei de fosfor, în mediul de cultură. Totodată, autorii menţionaţi au constatat că, auxina nu a exercitat un efect benefic asupra proliferării celulelor, în schimb, adaosul de lapte din nucă de cocos (bogat în citochinine), în mediul de cultură, a stimulat multiplicarea celulară. În plus, pentru obţinerea unei mai bune evoluţii a fitoinoculilor de proveniență tumorală, a fost necesară sporirea în substratul de cultură a concentraţiei de vitamină B_1 (*Nickell*, 1952; 1955).

Inocularea unui ţesut prelevat din *tumori* secundare de *crown-gall*, libere de bacterii, pe mediu *White*, simplu (1943), a făcut ca celulele respective să crească puternic, pe o durată nelimitată de timp, pe medii pe care celule similare, dar normale, nu au putut să crească.

Hildebrandt şi colaboratorii (1946a) au îmbunătăţit reţeta de mediu *White* (1943), astfel încât acesta să corespundă mai bine vitrocultivării ţesuturilor *tumorale* provenite de la diferite specii vegetale, ceea ce a permis punerea în evidenţă a faptului că, variatele tipuri de *tumori* manifestă unele particularităţi privind cerinţele lor în raport cu natura glucidelor introduse în

mediile de cultură. Ulterior, *Braun* (1956; 1958) a precizat că, celulele *tumorale* pot să-și sintetizeze toți factorii de creștere esențiali, de care ele au nevoie, existând o permanentă disponibilitate a acestora în a-și reorienta metabolismul, pentru a-și compensa – între anumite limite – lipsurile sau excedentele de compuși chimici absenți, ori prezenți în exces, în mediile lor de cultură. O astfel de reacție nu a fost întâlnită la celulele similare, normale, ale aceloraşi specii, lipsite de capacitatea de a efectua replieri metabolice. Mai apoi, *Black* (1957) a realizat vitrocultivarea pe mediu lipsit de auxină a unor fragmente de *Melilotus officinalis*, prelevate din țesut *tumoral*.

În anul 1955, *Nickell* a *grefat* țesuturi *tumorale*, provenite din vitrocultură, pe plante sănătoase. După un timp, la nivelul țesuturilor normale s-a remarcat apariția de celule care au prezentat simptome *neoplazice*.

Celulele *tumorale* manifestă și o capacitate ridicată de a absorbi eficient, din mediile lor de cultură, ionii de care ele au nevoie, chiar dacă în acele medii elementele chimice, sau compușii respectivi în care acestea se găsesc, se află în concentrații scăzute. La celulele similare, normale, astfel de capacități lipsesc. Acest fapt dovedește că, anumite schimbări care au loc în celulele *canceroase*, vegetale, vizează nu numai apariția de modificări metabolice anormale, ci și petrecerea unor transformări atipice, în cadrul sistemelor endocelulare, care se produc la nivel de biomembrane, precum și în mecanismele implicate în transportul și în efectuarea schimburilor ionice.

Experimente efectuate cu vitroculturi de țesut tumoral, de tip *crown-gall*, au permis evidențierea la nivelul acestora a producerii de schimbări permanente, calități dependente și de capacitatea mare de modelare genetică a tulpinilor bacteriene care provoacă tumorile respective. Astfel de țesuturi manifestă diferite abilități de a stimula sinteza acizilor nucleici și a proteinelor implicate în mitoză, sau de a interveni în activitatea generală de diviziune celulară și de creștere a acestora. Totuși, mecanismele fundamentale de funcționare a celulelor atinse de maladia *crown-gall* par să nu fie definitiv afectate (*Braun* și *Lipetz*, 1966).

Cercetările efectuate cu vitroculturi *anergice* au fost reluate de către *Limasset* și *Gautheret* (1950). Aceştia, în urma cercetărilor lor au ajuns la concluzia potrivit căreia celulele țesuturilor *anergice* manifestă o capacitate *tumorogenă* superioară aceleia marcată în cazul țesuturilor de *crown-gall*, vitrocultivate. În schimb, *Henderson* (1954) a stabilit, experimental, că atât celule *anergice*, cât și cele de tip *crown-gall*, posedă multe capacități fiziologice și metabolice asemănătoare, sau chiar similare.

Un examen histologic, comparativ, a țesuturilor *anergice* și a celor *tumorale*, de tip *crown-gall*, aflate în vitrocultură, a scos în evidență existența în celulele acestora a unor particularități citologice, care – în cea mai

mare parte – au depins de natura plantei gazdă. Astfel, la tutun, în țesuturile *tumorale*, proliferative, a avut loc o diferențiere celulară, cu producerea de elemente cribro-vasculare, în timp ce la țesuturile de *crown-gall*, de viță-de-vie, față de țesuturile normale (martor), celulele nou formate au fost mai puțin citodiferențiate (mai ales în ceea ce privește lignificarea), în ele acumulându-se cantități mai mici de taninuri sau de rafidii de oxalat de calciu, decât în celulele sănătoase. La țesuturile *anergice*, aceste fenomene au fost şi mai pregnante (*Czosnowski*, 1952).

Cercetându-se procesele de catabolism, s-a constatat că celulele țesuturilor *tumorale*, ca şi celulele canceroase ale animalelor, suferă o diminuare a schimburilor caracteristice unei respirații aerobe, în ele existând tendința instalării unui *catabolism* de tip *anaerob*.

În anul 1952, *Czosnowski* şi-a publicat rezultatele cercetărilor sale, comparative, efectuate pe vitroculturi de viță-de-vie, privind determinarea intensității respirației țesuturilor normale, a celor tumorale, de *crown-gall*, şi a celor *anergice*. În urma acestor cercetări, el a constatat o relativă echivalență între consumul de oxigen al țesuturilor normale, şi cel din țesuturile *anergice* la care acesta a fost doar cu ceva mai scăzut decât cel firesc şi cu puțin mai crescut, în țesutul tumoral de *crown-gall*. În schimb, în țesuturile *anergice* activitatea amilazică, fosfatazică, catalazică şi cea peroxidazică au fost mult mai crescută decât în țesutul normal, fenomen manifest mai moderat în țesutul tumoral de *crown-gall*.

Ulterior, însă, *Lance* (1956) a constatat că dezvoltarea țesutului *tumoral* de *crown-gall* a fost însoțită de o creştere a activității polifenoloxidazice şi a celei peroxidazice, în timp ce nivelul de catalază a rămas neschimbat.

Modificările celulare, intervenite în structurile *tumorilor genetice* care apar la hibrizii intra- sau interspecifici, pot fi recunoscute şi decelate de cele de tip *neoplazic*, identificate în țesuturile *habituate*, prin mai multe caracteristici semnalate de către *Braun* (1978) şi de *Bayer* (1982). Pe lângă aceasta, ei au adus precizări clare cu privire la diferențele şi asemănările care există între o *tumoră* vegetală, de origine genetică, şi *cancerul* de alt tip, prezent la plante. La aceste studii, s-au adăugat cercetările efectuate de către *Hagège* şi colaboratorii (1991c, 1991d, 1992), de *Crèvecoeur* şi colaboratorii (1992), precum şi de către *Bursch* şi colaboratorii (1992). Aceste studii aprofundate au permis relevarea principalelor caracteristici ale celulelor calusului *habituat*, *neorganogen*, în comparație cu cele specifice calusului normal. În principal, la calusul neorganogen, *habituat*, acestea constau într-o *intensă activitate de diviziune*, o *autonomie hormonală* şi *absența proceselor de diferențiere*, caracteristici generale care, în ansamblul lor, sunt speci-

fice și altor celule de natură *tumorală*. Astfel de celule prezintă un *raport nucleoplasmic ridicat*, și dețin *nuclei cu contur neregulat*, ce au *invaginațiuni*, ce posedă *mai mulți nucleoli*; celulele calusului generat din asemenea fitoinoculi sunt poliploide și aneuploide. Unele dintre aspectele enumerate anterior sunt semne de *apoptoză*, fenomene la care se adaugă evidențierea în celule a unui proces de *rarefiere a citoplasmei* și apariția de *defecte în ceea ce privește constituția pereților celulari*.

În ansamblul lor, astfel de fenomene endocelulare se aseamănă cu procesele întâlnite și în celulele țesuturilor *tumorale*, vegetale, de natură genetică. Numeroase dintre aspectele enumerate, prezente în celulele *tumorale*, vegetale, și cele întâlnite în celulele complet *habituate*, cum sunt: *conținut scăzut în compuși porfirinici*, nivel *ridicat de poliamine* și de substanțe *tiobarbituric reactive* (presupuse a fi malondialdehida și 4-hidroxinomenal), precum și de *enzime* care *protejează celulele împotriva oxigenului activ*, sunt manifestări caracteristice și celulelor *canceroase*, *animale* (*Gaspar*, 1995).

De regulă, celulele canceroase, vegetale, generează un *calus friabil*, ca urmare a esterificării pectinei (*Liners* și colab., 1994). Aceasta face ca, în stadiul de *metastazare*, celulele să-și *piardă capacitatea de adeziune*, unele de altele.

Originea celulelor *canceroase*, în vitroculturile vegetale, se pare că este monoclonală. Arareori, acestea derivă din nodulii albinotici prezenți pe suprafața calusului verde (*De Greef* și *Jacobs*, 1979; *Kevers* și colab., 1981).

Faza terminală a instalării progresive a stării *neoplazice* se caracterizează și printr-o *pierdere a capacității de structurare organogenă a meristemelor primare*, ceea ce duce la *anularea definitivă a totipotenței acestor celule*.

Alteori, după *Meins* (1987; 1989) și după *Crèvecoeur* și colaboratorii (1992), anularea potențialului organogen al celulelor *habituate* poate fi reversibilă, situație în care se păstrează capacitatea calusului respectiv de a forma lăstari, pierzându-se doar aptitudinea rizogenă a celulelor acestuia; faza terminală a procesului *neoplazic* este considerată ca fiind atinsă atunci când meristemul devine inapt de a genera celule capabile de diferențiere, respectiv de a forma organe.

În anumite cazuri (după *Horgan*, citat de *Pierik*, 1989), *habituația* este ereditară și nu este de natură epigenetică.

În celulele *habiatuate* ale calusului neorganogen, destabilizările metabolice – cauzate de stresul multiplu – duc la acumularea în ele, din abundență, a acizilor grași liberi și a malondialdehidei, precum și la o descreștere

a lipidelor nesaturate. Aceste fenomene pot fi acceptate ca fiind indicatoare ale unor ridicate peroxidări ale lipidelor (*Hagège* şi colab., 1990b).

Transformările care accelerează procesul *neoplazic* sunt fenomene legate şi de prezenţa în celulele ţesuturilor *habituate* a unor proteine specifice, *prooncogene* (*Persinger* şi *Town*, 1991; *Hagège*, 1993; *Tacchini* şi colab., 1995; *Mérillon* şi colab., 1995; *Brezeanu* şi colab., 1998, etc.). Şi după *Gaspar* (1995), în celulele vegetale, fenomenele *neoplazice* pot fi intermediate de *prooncogene*, radicalii liberi fiind cei incriminaţi ca fiind responsabili de provocarea unor mutaţii la nivelul unor gene cheie.

Se pare că, în cazul *calusului habituat*, neorganogen, constituit din veritabile celule *canceroase*, malignizarea a fost indusă în lipsa agenţilor fitopatogeni. Celulele derivate din celulele mutante, adaptate la surmontarea efectelor *anitoxidante* generate în regim de vitrocultură, prin proliferări repetate ele dau naştere la populaţii monoclonale, care pot, sau nu, să aibă capacitatea de a se adapta şi surmonta efectele *anitoxidanţilor* (*Hagège*, 1996). În calusul *habituat*, neorganogen, există posibilitatea ca unele celule să dobândească capacitatea de a descreşte producţia de radicali liberi implicaţi în procesele de organogeneză, fenomene care vizează atenuarea emisiei de etilenă, a catabolismului auxinic, a fotosintezei, a activităţii peroxidazice, şi altele. Din acest punct de vedere, însă, *habituaţia* şi *hiperhidria*, ca procese *neoplazice*, ar fi reacţii de *cancerizare*, de facturi diferite (*Hagège*, 1996).

O mare parte dintre punctele de vedere prezentate anterior sunt completate de rezultatele obţinute în urma cercetărilor efectuate, şi publicate, de către de *Le Dily* şi colaboratorii (1998), experimente executate cu calus *habituat* de sfeclă de zahăr, considerat ca un model în analizarea deviaţiilor metabolice care conduc la *cancerizarea* celulelor vegetale.

Gaspar, singur sau împreună cu colaboratorii săi, într-o serie de lucrări efectuate mai ales între anii 1991-1995 (1991; 1992 b; 1994; 1995), a încercat să definească, şi să descrie, aspectele care caracterizează procesele de *cancerizare* – la celulele vegetale cultivate *in vitro* – în absenţa agenţilor fitopatogeni, cum sunt fenomenele întâlnite în cazul *habituaţiei* (*Meins*, 1982, 1987 şi 1989), şi cel al *hiperhidriei*.

Hiperhidria este un fenomen care afectează, adeseori, mai ales tulpinile şi frunzuliţele neoformate la nivelul fitoinoculilor. Astfel de vitroplantule devin inapte de a se aclimatiza la regimul de viaţă *ex vitro*, consecinţă care duce la producerea de pagube însemnate în industria de micropropagare. După o serie de autori (*Debergh* şi colab., 1981; 1992; *Kevers* şi colab., 1984; *Pâques* şi *Boxus*, 1987a şi b; *Gaspar* şi colab., 1987; *Gaspar*, 1991; *Ziv*, 1991, şi alţii), *hiperhidria* se produce şi la nivelul culturilor de calus, şi chiar şi a celor de celule.

Multe dintre fenomenele structurale și biochimice prezente și descrise în cazul celulelor *canceroase* animale se regăsesc, și sunt manifeste, și în celulele vitroculturilor *habituate*, respectiv și în cele ale fitoinoculilor *vitrificați* (*hiperhidrici*). În principal, transformările caracteristice *malignizării*, observate în celulele vegetale atinse de un proces de *cancerizare*, vizează producerea de *dezordini endocelulare*, în ceea ce privește *metabolismul zaharozei*, al *azotului*, al *conținutului în compuși tetrapirolici, sinteza și emananrea excedentară de etilenă*, ș.a.m.d. Cel puțin în fazele inițiale ale malignizării, dar și pe parcursul progresării procesului *neoplazic*, celulele clonate – care au dobândit deja un statut *canceros* – devin *inapte de diferențiere*, de *organo-* sau *embriogenă*, stare care se pare că se instalează încă la nivelul *meristemelor primare*, din cauza *stresului oxidativ*, care implică și aceste celule. Adeseori, celulele *hiperhidric* malformate devin și total *habituate* (*Gaspar*, 1995).

Habituarea, ca și *hiperhidria*, sunt stări de patogenitate celulară, manifestă la fitoinoculi, ce se pot instala gradat sau brusc. În cazul *habituării*, celulele unor astfel de fitoinoculi dobândesc o capacitate autonomă de multiplicare și de creștere, în absența unui aport extern de auxine și/sau de citochinine, ori de vitamine, fenomene asemănătoare celor constatate în cazul transformărilor suferite de celulele țesuturilor *tumorale* de tip *crown-gall*, care sunt, la rândul lor, *hormonal autotrofe*. Astfel de celule este posibil să devină nereactive la anumiți stimuli endogeni sau exogeni, fie să sufere o alterare a sensibilității acestora la existența în mediul lor de cultură a unor regulatori de creștere, ori să le fie afectat metabolismul etilenei și cel al poliaminelor; alteori, în celule *neoplazice* vegetale, se remarcă o acumulare a glicozidului dehidrodiconiferil (alcool care poate înlocui citochinina, în controlarea diviziunii celulare), ori să se înregistreze o creștere în acestea a conținutului în diacilglicerol, în inozitol fosfat, și în alți compuși. Astfel de manifestări sunt privite, în general, ca fenomene epigenetice care, uneori, pot să fie reversibile (*Gaspar*, 1995).

De Greef și *Jacobs* (1979), și *Kevers* și colaboratorii (1981a și b), au constatat că masa de calus *habituat*, de sfeclă de zahăr, generat dintr-o aceeași sursă vegetală, a prezentat – pe parcursul cultivării acestuia *in vitro* – trei tipuri celulare diferite din punct de vedere calitativ și fiziologic, precum și în ceea ce privește culoarea, consistența, capacitatea calusului de morfogeneză, acumularea în el a anumitor compuși care vizează producerea în celulele lui de alterări metabolice, sau care acționează în celule și în țesuturi în direcția dezechilibrării conținutului în apă, ori manifestarea unor reacții particulare ale țesutului calusal legate de existența în mediul de cultură a unor fitohormoni, morfogeneza la nivelul acestuia fiind dependentă, în

primul rând, de natura regulatorilor de creştere introduşi în substratul de cultură; de specificul ţesutului *neoplazic*, de originea acestuia, şi altele.

Pe parcursul unui an de vitrocultură, în masa calusului s-a putut identifica existenţa de arii calusale normale, compacte şi verzi, care în subcultură au necesitat prezenţa auxinei şi a citochininei în substrat (calus categorisit ca fiind de tip *organogen*), în timp ce o altă parte a calusului a fost de tip *habituat*, dar *organogen*, iar o a treia tipologie de calus a constat din ţesut calusal *habituat*, *neorganogen*, *hiperhidric*, friabil, care a avut un conţinut scăzut de clorofilă, în cloroplaste, respectiv de celuloză şi de lignină, în pereţii celulari; totodată, în acest ultim tip de calus, în structurile sale s-a remarcat absenţa diferenţierii de elemente traheale, şi prezenţa la nivelul celulelor sale a unor manifestări juvenile. În tulpinile şi în frunzuliţele vitroplantulelor *hiperhidrice* (*Gaspar* şi colab., 1991), ca şi în cele *habituate* – inclusiv în calus – s-a observat existenţa unui conţinut scăzut în peroxidaze, mai ales în peroxidaze acide (*Bouchet* şi colab., 1978) şi în siringaldazin-oxidaze, compuşi care sunt implicaţi în rigidizarea şi lignificarea pereţilor celulari (*Kevers* şi colab., 1981a şi b; *Gaspar* şi colab., 1983 etc.). Totodată, la astfel de fitoinoculi s-a observat şi o micşorare a producţiei de etilenă, fitohormon cunoscut ca fiind implicat în controlul enzimatic al biosintezei peretelui celular pectocelulozic (*Gaspar* şi colab., 1988; *Köves* şi *Szabo*, 1987; *Campell* şi *Town*, 1991 şi *Gaspar*, 1995).

La cele semnalate, putem adăuga şi faptul că, *stresul oxidativ* – atât la animale, cât şi la plante – la nivel celular cauzează iniţierea proceselor de *cancerizare* (*Alberts* şi colab., 1989; *Winston*, 1990; *Gaspar* şi colab., 1992a şi b; *Gaspar* 1995 şi 1998). Stresul oxidativ provoacă nu numai iniţierea stării de malignizare, ci şi o *permanetizare* a *statutului de celulă canceroasă*.

Situaţiile stresante, la care fitoinoculii sunt expuşi în decursul regimului şi a procedurilor de vitrocultură, afectează celulele prin şocurile la care acestea se pot, sau nu, să se adapteze. Reacţia de apărare a acestor celule la stres se traduce prin producerea în ele de enzime şi de radicali liberi, ceea ce conduce la generarea şi acumularea în acestea de *oxigen activ* (*Hagège* şi colab., 1992b; *Franck* şi colab., 1997a). Există o multitudine de surse şi *„specii" reactive de oxigen* (SRO), care sunt asociate cu moartea celulară, chiar şi în cazul interacţiilor plantă-patogen (*Brezeanu* şi *Voichiţă*, 2006).

Şimpla *rănire* a *ţesuturilor*, în momentul prelevării lor, chiar şi în cazul dimensionării unor inoculi pe parcursul proceselor de subcultură, constituie un *stres* traumatogen, reacţie care poate fi amplificată de natura şi concentraţia compuşilor prezenţi în mediul de cultură, mai ales a regulatorilor de creştere şi a combinaţiilor realizate între aceştia, existenţa în sub-

strat a unui excedent de azot, acumularea de gaze în atmosfera din recipientele de cultură, tipul și concentrația acestora, precum și de vapori, producerea de șocuri osmotice – în urma infiltrării a o parte din mediul de cultură în spațiile intercelulare – excedentul de etilenă, factori care pot acționa fiecare separat, sau a căror efecte se pot combina ori cumula, în anumite situații consecințele lor însumându-se sau potențându-se reciproc.

Acumulările de poliamine în celulele *habituate*, sau în cele *hiperhidrice*, se constituie în periculoși factori de stres.

Pe de altă parte, se pune problema în ce măsură acumularea de poliamine, în celulele vegetale, mențin starea *canceroasă*, sau dacă ele se combină cu nitriții și formează nitrozamine, care, ele însele, sunt deosebit de *cancerigene* etc. (*Gaspar*, 1995).

Fenomenele implicate în *cancerizarea* celulelor, în general, și a celor vegetale, în special, precum și găsirea în celulele plantelor de *similitudini* de reacție cu manifestările *neoplazice* care se petrec în oncogeneza celulelor animale (investigându-se posibilele puncte asemănătoare, în ceea ce privește declanșarea și desfășurarea acestor procese) sunt greu de intuit și de adus la „un numitor comun". Cu toate acestea, unele aspecte care privesc *malignitatea* se referă la existența atât în celulele vegetale, cât și în cele animale, a unor manifestări cu caracter aseamănător, categorie în care, în mare, se încadrează câteva caracteristici comune ale acestora, cum sunt: perpetua *juvenilitate a celulelor canceroase*, *proliferarea haotică a acestora*, *producerea de dezorganizări endocelulare*, *pierderea aptitudinii celulelor de a se diferența*, și altele.

La plante, *cancerul* îmbracă diferite aspecte, iar fenomenele *neoplazice* evidențiabile în vitrocultură sunt, la rândul lor, manifestări particulare și discutabile, în ceea ce privește prezența și implicarea acestora – ca reacții specifice sau comune – în toate celulele afectate de procesele de *oncogeneză*.

După cum s-a văzut, pe de o parte, cercetările care au avut ca modele experimentale fitoinoculi au condus la obținerea de rezultate care au fost interpretate diferit, de către variații autori, atât în ceea ce privește manifestările de *oncogenitate*, evidențiate în variatele tipuri de celule vitrocultivate, cât și a condițiilor care sunt reaponsabile de declanșarea și menținerea proceselor de malignitate, mulți vitroexperimentatori vegetali având ca obiect de studiu țesutul calusal, ori țesutul *habituat* sau *hiperhidric*, caulinar sau foliar, din experimentele de acest tip lipsind însă modelele constând din culturi de celule (libere sau imobilizate), ori cele de protoplaști. Pe de altă parte, rezultatele cercetărilor efectuate pe modele experimentale constând din *calus*, în care s-au urmărit reacțiile celulelor pe parcursul procesului de *cancerizare*, sunt mai greu de extrapolat la alte tipuri de vitroculturi, deoa-

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

rece țesutul calusal, în sine, este un țesut proliferativ, ale cărui celule posedă capacități scăzute de diferențiere, iar atunci când aceasta, sau morfogeneza, sunt prezente, pe parcursul instalării *neoplazmului* calusul devine neorganogen sau neembriogen. De-a lungul timpului, s-au făcut numeroase comparații între cancerizarea de tip *habituat*, și cea de tip *hiperhidric*. Cu toate că, cele două forme de manifestare malignă sunt provocate de cauze diferite, în celulele atinse de fenomenele *neoplazice* pot fi identificate reacții asemănătoare, în ceea ce privește unele procese de natură endocelulară, atât la nivel structural și funcțional, cât și biochimic.

Este cert faptul că, în celulele *canceroase*, aflate fiind într-o permanentă stare de stres, se ajunge la acumularea de poliamine (*Smith*, 1985). Legat de aceste fenomene, se ridică o serie de întrebări, cum ar fi: 1. în procesele de *cancerizare*, acumularea poliaminelor precede aceste stări, sau în ce măsură fenomenele *neoplazice* fiind deja inițiate în celule, acestea favorizează creșterea în celule a nivelului poliaminelor; 2. poliaminele controlează nivelul peroxidazelor, prin intermediul proprietăților lor de a stabiliza calitățile biomembranelor (*Altman* și colab., 1977), sau ele intervin în înlăturarea efectului exercitat de radicalii liberi, asupra celulelor (*Diazani*, 1989), ori, dimpotrivă, prin oxidare (*Angelini* și *Federico*, 1989) acestea produc H_2O_2, în pereții celulari; 3. mențin poliaminele starea de *oncogenitate*, ori ele se combină cu nitriții și formează *nitrozamine*, compuși puternic cancerigeni, incriminați ca fiind cauza principală a instalării în celule a fenomenelor *neoplazice* (*Hildrum* și colab., 1976). După *Gaspar* și colaboratorii (1998) aceste aspecte, în mare, corespund cu modificările semnalate ca fiind prezente și în celulele *canceroase*, animale (*Porciani* și colab., 1993).

Gaspar și colaboratorii (1998), în speculațiile lor teoretice, făcute asupra specificului celulelor *canceroase* vegetale, au subliniat, în deosebi, importanța H_2O_2 (peroxid generat prin degradarea poliaminelor) în *malignizarea* și metabolismul celulelor *neoplazice*, ei referindu-se și la creșterea activității superoxiddimutozei în aceste celule, precum și la o reducere a activității catalazice, ceea ce conduce – în celulele afectate de această stare – la declanșarea și menținerea unui metabolism atipic, cauzat de dereglările biochimice intervenite în urma modificărilor produse în metabolism glucidic, azotic și în cel al hemoproteinelor (cum ar fi sinteza de peroxidaze, a catalazei și a citocromilor), fapt care facilitează formarea și acumularea în celule de H_2O_2, provocând, totodată, și o schimbare a proceselor de respirație. O eliberare de H_2O_2 a fost detectată și în celulele tumorilor umane (*Burdon*, 1996). Acest peroxid (H_2O_2), în dependență de concentrația sa în celule, poate stimula replicarea ADN-ului, sau poate crește șansele produ-

cerii *apoptozei*, mecanismele implicate în apoptoză ne fiind foarte diferite de cele descrise anterior (*Burdon*, 1996).

Unele studii referitoare la *oncogenitate*, la plante, au fost făcute și de către cercetători de la noi din țară (*Brezeanu* și colab. 1996; 1998). Aceste cercetări s-au referit la studii citologice, respectiv ultrastructurale, întreprinse asupra celulelor tumorale, prin infecții provocate cu *A. tumefaciens*.

Articole de sinteză referitoare la principalele aspecte care caracterizează diferitele forme de *neoplasm*, la plante, cu precădere manifeste în regim de vitrocultură, la noi în țară au fost publicate de către *Bader* și colaboratorii (1981), *Cachiță* (2001); *Cachiță* și *Ardelean* (2004; 2005); *Cachiță* și *Crăciun* (2004), mai ales în anii 2001-2005. După cum se va putea vedea în subcapitolul 1.2 al prezentului tratat, legat de problematica cancerului vegetal, aspectele care ne-au preocupat pe noi, cu preponderență, au fost cele legate de *neoplasmul hiperhidric* (*Cachiță*, 1987; *Cachiță* și colab., 1991; *Cachiță* și *Crăciun*, 1990; 2004).

Studiile în domeniul *neoplazmelor*, la plante, se află în topul cercetărilor moderne de biologie vegetală, respectiv de fiziologie, de genetică, de ameliorare, ultrastructură și de biologie moleculară, ele fiind efectuate mai ales pe modele experimentale vitrocultivate. Astfel de studii sunt efectuate pe plante, plantule, organe, țesuturi și celule – normale sau afectate de diferite forme de *cancer* – rezultatele obținute fiind comparate cu manifestările de acest tip descrise la celulele animale, precum și la cancerul manifestat la nivelul organismului uman.

Pe măsură ce se perfecționează tehnicile de investigație în biologie, în fizică, în biochimie, precum și în alte specialități științifice tangente acestor ramuri teoretice și practice, se fac progrese din ce în ce mai însemnate și în descoperirea mecanismelor implicate în declanșarea și propagarea fenomenelor *neoplazice*, modelele experimentale și cercetările efectuate în domeniul plantelor servind, și ele, de exemplu, la marcarea unor pași importanți în înțelegerea transformărilor care se petrec în celulele afectate de *cancer* și, eventual, în găsirea de remedii prin care celulele *maligne* să fie readuse la starea de normalitate.

Legat de alterările *neoplazice* produse la nivelul fitoinoculilor, noi ne-am preocupat îndeosebi de studierea unor aspecte morfofiziologice, biochimice și ultrastructurale, care caracterizează *hiperhidria* (respectiv *vitrificarea*) la vitroculturile vegetale (vezi capitolul 2 al prezentului tratat.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.4.1.4. Studierea fenomenelor de *simbioză*, prin intermediul vitroculturilor vegetale

În lumea vie, în diferite condiții ecologice, viețuitoarele coexistă – într-un același areal – fie solitare, fie în asociație cu alte organisme, în regim pasiv, activ, *simbiont* sau *parazitar*.

Cunoașterea raporturilor de *simbioză*, care se stabilesc în mod natural între plante și variatele specii de microorganisme, a condus la nașterea unei importante ramuri fitobiotehnologice moderne, aceea axată pe producerea de biopreparate de *biotizare*, menite să faciliteze instalarea la nivel de sistem radicular a unor *bacterio-* sau *micorize*, care să optimizeze creșterea, dezvoltarea și productivitatea diferitelor specii vegetale, de interes economic.

În marea majoritate a cazurilor, *biotizarea* plantelor se referă la realizarea – la nivelul sistemului radicular – de raporturi de *simbioză*, artificial create între țesuturile vegetale și microorganismele existente în mod natural în sol, sau administrate de către biotehnologi în perimetrul ecologic al acestora (*in vitro* sau în perioada de aclimatizare a exvitroplantulelor), care să exercite efecte benefice asupra vieții ambilor parteneri implicați în asociația devenită funcțională. După cum s-a putut vedea în subcapitolul 1.4.1.2, *biotizarea* poate să se refere și la asociații artificial create, în regim de fitovitrocultură, cu rol pozitiv în optimizarea potenței organogene a acestora, a capacității de adaptare și de rezistență a exvitroplantulelor la stres, respectiv la variate condiții create artificial.

În domeniul *simbiozei*, într-o lucrare monografică publicată în anul 2000, *Zamfirache* și *Toma* au făcut o analiză de ansamblu, pertinentă, cu privire la variatele tipuri de relații *simbionte* întâlnite în lumea vie, preponderent în cea vegetală, carte care conține referiri la *ecto-* și *endosimbioze*, la *simbiozele* ecologic obligate, la cele facultative, mutualiste ș.a.m.d., clasificarea lor făcându-se în funcție de variatele criterii alese pentru definirea acestui fenomen natural, complex. În prezentarea acestora, s-a avut în vedere analizarea – în funcție de variați factori endogeni și exogeni – a intensității relațiilor de asociere a microorganismelor cu plantele, interdependența partenerilor, rolul fiziologic al simbiozei realizate etc.

Existența unor relații de factură specială, care se stabilesc între plante, sol, și microorganismele din el, au fost intuite încă din cele mai vechi timpuri, fără ca – la acea dată – să fie cunoscuți factorii biotici implicați în astfel de procese. De exemplu, floricultorii cunoșteau – de secole – faptul că, pentru creșterea orhideelor, plante apreciate pentru aspectul și mirosul delicat al minunatelor lor flori, se impune cultivarea acestora în amestecuri speciale de pământuri, în componența substratului intrând pe lângă turbă și sol

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(de proveniență variată), și scoarță de arbori sau frunze putrezite, provenite de la diferite specii vegetale, turbă ș.a., rețete considerate, mult timp (mai ales până la dezvoltarea tehnicilor de micropropagare), drept secrete de familie. Acțiunea favorabilă a unor astfel de amestecuri a constat mai ales în prezența în compoziția substratului în care se află amplasate rădăcinile, a unor *fungi micorizali*, cu acțiune benefică (chiar vitală pentru aceste plante), în ceea ce privește nutriția orhideelor.

În secolul XX, s-au întreprins studii amănunțite cu privire la punerea pe baze științifice a cunoștințelor referitoare la relațiile de de tip *simbiont*, existente în natură, specificitatea acestora (în cazul raporturilor stabilite între plante și microorganismele din sol), respectiv rolul jucat în viața cormofitelor de către unele bacterii sau miceliile fungice prezente în substratul în care rădăcinile se află fixate. Actualmente, se cunoaște că *simbioza* deține un rol esențial în biologia majorității speciilor vegetale, nu numai în aceea a orhideelor.

După cum s-a mai arătat, în *rizosferă* există o multitudine de microorganisme, variate ca filogenie și ca mod de viață. Acestea își desfășoară existența în sol și se hrănesc cu exudate, secreții, lizate și cu mucilagii, provenite din activitatea biologică a rădăcinilor; compuși amintiți, la rândul lor, influențează natura și calitatea rizosferei, de factorii bioecologici depinzând, în mare măsură, buna funcționare a sistemului radicular, care au consecințe favorabile asupra calității vieții, a dezvoltării și a productivității plantelor.

Rai (2001) considera că aproximativ 90% dintre cormofite au raporturi de *simbioză* cu bacteriile sau cu *fungii* existenți în ecosistemul în care ele trăiesc.

Marea majoritate a speciilor vegetale, la nivelul rădăcinilor sunt purtătoare de *simbioze* cu *fungi*, asociații de tip *micorizal* (endo-, ecto- sau *endo-ectomicorize*, cel mai adesea de tip *arbuscular*). Astfel de asociații exercită efecte pozitive asupra biologiei partenerilor implicați în asemenea relații, atât în ceea ce privește metabolismul plantei gazdă, cât și cel al ciupercii; alteori, *simbioza* se realizează între plante și *bacterii* (*bacteriorize*), microorganismele colonizând fie suprafața externă a rădăcinilor, fie ele se instalează în spațiile intercelulare ale cortexului radicular (*exo-* sau *ecto-bacteriorize*); în cazul *endobacteriorizei*, bacteriile *simbionte* pătrund și invadează interiorul celulelor.

Genurile și speciile de bacterii și de fungi implicate în *simbiozele* vegetale sunt foarte variate. Uneori, o *asociație simbiontă* poate fi caracteristică numai unui anumit soi de plantă; alteori, relația este mai puțin selectivă și într-o măsură mai mică ea prezintă specificitate.

Dar, între rădăcinile plantelor şi rizosferă se pot stabili şi reacţii de respingere, ca urmare a prezenţei în zona rizogenă a unor compuşi *alelopatici*, eliminaţi în sol de către celulele sistemelor radiculare, substanţe care determină stabilirea, sau nu, a unor asociaţii vegetale şi natura acestora. Astfel de produşi pot menţine la distanţă rădăcinile altor specii vegetale, din imediata lor apropiere, „marcând teritoriul" cu substanţe provenite fie din exudatele radiculare, fie în urma morţii şi a descompunerii a o parte dintre organele căzute pe sol (cum sunt frunzele, învelişurile florale, ori fructele), sau chiar a rădăcinilor, proces în urma căruia rezultă variate componente organice, mai mult sau mai puţin complexe, care acumulate în substrat acţionează – într-un timp mai scurt sau mai îndelungat – asupra vieţii multor organisme aflate în rizosferă. Astfel de compuşi pot influenţa nu numai natura vieţuitoarelor prezente în rizosferă, ci pot şi condiţiona, în cadrul ecosistemelor, componenţa asociaţiilor vegetale (*Reigosa* şi *Pedrol*, 2002).

Totuşi, *O'Gara* (1996) previziona că, în curând, în agrotehnica modernă, *bacterizarea* va lua locul fertilizării chimice a terenurilor şi, cel puţin în parte, cel al pesticidelor.

În urma extinderii la nivel industrial a procedurilor de micropropagare, pentru mărirea capacităţii adaptative a exvitroplantulelor la viaţă în condiţiile mediului natural, prealabil plantării acestora într-un substrat septic, ele trebuie să beneficieze de o *biotizare*, respectiv de aplicarea în zona bazală a tulpinilor (înrădăcinate sau nu), ori în sfera lor radiculară (acolo unde rizogeneza este prezentă), a unor preparate bacteriene sau fungice, *simbionte*, după specificul plantulelor generate *in vitro*, proceduri care, în timp, vin în sprijinul stimulării şi a susţinerii unei bune dezvoltări a rădăcinilor, intermediindu-se astfel şi instalarea unor cât mai rapide şi eficiente relaţii între plantule şi substratul în care ele au fost amplasate în momentul transferării lor *ex vitro*. În acest mod, se favorizează construirea în jurul sistemului radicular a unei rizosfere optime şi active, menită să asigure o cât mai bună aprovizionare a radicelelor, respectiv a plantelor, cu apă şi cu săruri minerale. Prin astfel de proceduri de *bacterizare* sau de *micorizare* se atinge un procent ridicat de reuşită în supravieţuirea exvitroplantulelor, postaclimatizare, şi o mai rapidă creştere a lor, în momentul amplasării acestora într-un loc definitiv de plantare (*Rhodes*, 1983).

Biotizarea, prin *bacterizare* sau prin *micorizare*, aplicată în zona bazală a exvitroplantulelor, se poate face, după caz, cu *rizobacterii* (*Agrobacterium rhizogenes*, *Rhizobium*, *Frankia*, şi altele), sau cu *fungi endomicorizali* (*Glomus*, *Gigaspora* etc.), şi/sau cu fungi *ectomicorizali* (*Hebeloma*, *Laccaria*, *Piloderma*, *Pisolithus*, *Paxillus*, *Cenococcum* etc.).

Nowak (1998) a fost de părere că *biotizarea* prin *cocultură*, realizată *in vitro* prin *asocierea* artificială a vitroculturilor vegetale cu microorganisme *simbionte*, induce – la nivelul rădăcinilor plantelor – producerea de schimbări metabolice care conduc nu numai la o creștere a procentului de supraviețuire al exvitroplantulelor, ci și la o mărire a gradului lor de rezistență, la *stresul* biotic și/sau abiotic.

Studierea *in situ* sau *in vitro* a diferitelor forme de *simbioză* a condus la dezvoltarea unor industrii biotehnologice axate pe producerea de preparate de *bacterizare* sau de *micorizare*, care administrate fiind în zona bazală a vitroplantulelor, prealabil transferării lor *ex vitro*, ori în momentul amplasării exvitroplantulelor într-un substrat natural, asigură acestora o creștere și dezvoltare de excepție.

Un exemplu de *bacterioriză* eficientă, naturală, sau obținută artificial, este acela al asociației *simbionte* realizată între *bacteriile azotofixatoare* și celulele țesuturilor radiculare ale plantelor leguminoase.

1.4.1.4.1. Coculturi *simbionte* realizate între fitoinoculi și bacterii (*bacterizarea*), respectiv *bacteriorizarea*

După cum a rezultat din subcapitolul 1.2. în natură există numeroase tipuri de relații *simbionte*, care se pot stabili între rădăcinile plantelor și *microorganisme*, una dintre acestea fiind aceea formată între organismele vegetale și *bacterii*, respectiv *bacteriorizele*. Dar, *simbioza* dintre *bacterii* și celulele rădăcinilor nu este atât de răspândită în ecosisteme, precum este aceea realizată între sistemul radicular și fungi din sol (*micorizele*).

Vitrotehnicile prin care se obțin *asociații simbionte* presupun utilizarea unor proceduri de vitrocultură, în care materialul biologic inoculat variază de la protoplaști, celule, țesuturi și până la organe, cu precădere rădăcini.

O primă problemă care se ridică în fața cercetătorilor axați pe studii de introducere în celulele plantelor a unor bacterii cu capacități *diazotrofe* (*azotofixatoare*), modificate sau nu genetic, a fost aceea a asigurării stabilității și a funcționalității unei *endosimbioze* deja instalată la nivelul unor *vitroculturi vegetale*. Deci, într-o primă etapă, specialiștii au urmărit realizarea unei *endocitobioze* stabile, mediate între bacterii și celulele gazde, cu instalarea unei *exocitobioze*, care să se manifeste între celula cu o *citobioză* endocelulară și celulele învecinate, din cadrul țesutului. Acest fapt presupune existența între celulele țesuturilor vegetale a unei comunicări eficiente, realizate prin intermediul plasmodesmelor, situație în care acestea să dețină o funcționalitate normală.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Una dintre țintele cercetărilor moderne, axate pe problematica studierii modalităților de încorporare a bacteriilor *azotofixatoare*, în corpul variatelor specii de cormofite, altele decât cele leguminoase, și de analizare a consecințelor producerii unor astfel de transformări, a constat în *colonizarea* cu bacterii *diazototrofe* nu numai a rădăcinilor, ci și a celulelor organelor situate în partea aeriană a plantelor.

Tentativele de realizare a unor *endosimbioze* (*endocitobioze*), prin introducerea de bacterii *diazotrofe* în *protoplaștii* speciilor de cormofite, au eșuat, în literatura de specialitate nefiind încă semnalate cazuri de obținere a unor astfel de simbioze stabile. O *asociație* simbiontă este reușită atunci când ea este funcțională nu numai pe perioada menținerii acesteia *in vitro*, în regim de *cocultură*, ci și după transferarea plantulelor regenerate din fitoinoculi, în condițiile mediului aseptic, în regim natural de viață (*Preininger* și *Gyurján*, 2001).

După *Preininger* și *Gyurján* (2001), se pare că o *asociere* eficientă între bacteriile *azotofixatoare* și gazdele cormofitice are o mai mare șansă de succes atunci când colonizarea bacteriilor s-a realizat în spațiile intercelulare, în regim de *exocitobioză* și nu intracelular.

În colonizarea fitoinoculilor, în ultimii 30 de ani, au fost utilizate variate metode experimentale de *cocultură*, ele constând, preponderent, dintr-o asociere a unor celule sau țesuturi vitrocultivate – potențiale plante gazde, natural nesimbionte – cu bacterii *diazotrofe* (*azotofixatoare*); răspândirea acestor bacterii în fitoinoculi, sau în organele exvitroplantulelor, se poate realiza în diferite moduri. În general, în urma experimentelor efectuate cu suspensii celulare, sau cu calus de grâu, de muștar (*Child*, 1975), de morcov (*Ranga Rao*, 1975, 1976), ori de tutun (*Gibson* și colab., 1976), în condițiile *cocultivării* acestora cu bacteria *Rhizobium*, s-a remarcat atașarea acestora pe suprafața calusului, sau localizarea lor în spațiile intercelulare ale acestuia, ori în onduleurile calusale; bacteriile care au penetrat endocelular, nu numai că nu au generat noduli, ci, dimpotrivă, la nivelul biostructurilor acestea au provocat distrucții severe (*Child*, 1975). Vitroculturile constând din calus de grâu, de tutun, sau de alte specii vegetale, nu au supraviețuit, atunci când ele au fost inoculate cu *Azospirillum* (*Child* și *Kurz*, 1978; *Vasil* și colab., 1979). Dar, în schimb, într-un experiment similar – constând dintr-o *cocultură* de calus de trestie de zahăr, efectuată împreună cu *Azospirillum*, timp de 18 luni – s-a înregistrat o bună creștere a țesuturilor, în condițiile în care în mediul lor de cultură a existat un deficit de azot (*Vasil* și colab., 1979). În regim de *cocultură* a calusului, în prezența bacteriei *Azospirillum* s-a remarcat instalarea microorganismului respectiv numai în spațiile intercelulare ale acestuia, la nivelul unui astfel de calus obținându-se regene-

rarea de plante; dar, celulele lăstarilor neoformați din aceste calusuri nu au conținut *Azospirillum*.

În urma experimentelor efectuate cu coculturi de *Azospirillum brasiliense* (bacterie microaerofilă, diazotrofă), în suspensii celulare embriogene de *Penisetum* și de *Paniculum maximum*, precum și în țesuturile embrionare colonizate de *Azospirillum*, s-a identificat prezența unei activități nitrogenazice (*Pence* și colab., 1982).

În anul 1984, *Aloysius* și *Paton* au reușit să stabilească o *asociație* artificială între plante, și bacterii *azotofixatoare* de tipul *Azotobacter*, *Pseudomonas* și *Beijerickia*, utilizând *protoplaști bacterieni*. Aceștia au avut capacitatea (nu se cunoaște cum) de a traversa peretele celulelor vegetale, colonizându-le. Dar, după cum menționau *Preininger* și *Gyurján* (2001), în general activitatea *azotofixatoare* a bacteriilor, în țesuturile vegetale, a fost foarte slabă, și greu de măsurat.

Gusev și colaboratorii (1986) au înregistrat rezultate pozitive în ceea ce privește vitroculturile de celule de tutun, *asociate* în regim de *cocultură* cu cianobacteria *Anabena variabilis*. La nivelul calusului format din celulele care au reacționat favorabil la infestare cu *azobacteria* amintită anterior, s-a realizat inducerea proceselor de organogeneză; în plantele regenerate din astfel de calusuri s-a identificat, microscopic, prezența filamentelor de *Anabena*, fie în xilem și în spațiile intercelulare ale parenchimului caulinar al acestora, fie la nivelul stomatelor din epiderma foliară. Dar, tulpinițele regenerate din astfel de calusuri neavând rădăcini, ele nu au putut fi plantate în sol. În țesuturile vitroplantulelor cultivate pe medii cu deficit de azot, cianobacteria respectivă a generat *heterocişti*. În experimentul menționat, activitatea acetilen reductivă (reacție standard de determinare a prezenței nitrogenazei în celule) a fost înregistrată atât în culturile mixte de *Anabena*, cât și în lăstarii regenerați la nivelul calusurilor aflate în regim de *cocultură* cu această cianobacterie *diazotrofă* (*Chen* și colab., 1991, 1992).

Pe această nouă linie de cercetare se înscriu și experimentele axate pe elucidarea aspectelor referitoare la efectele favorabile sau nefavorabile exercitate de regimul de *cocultură* a țesuturilor sau a celulelor vegetale, în condițiile vitrocultivării lor în *asociere* cu diferite microorganisme, în special *simbionte*, astfel de studii deschizând, în biotehnologia modernă, noi direcții de investigare, din punct de vedere teoretic și aplicativ, a multipotenței fitoinoculilor.

Acest gen de cercetări au deschis și calea extinderii în practică a *biotizării*, vitrotehnică considerată ca fiind revoluționară în biotehnologia vegetală actuală, mai ales în stadiul de aclimatizare a exvitroplantulelor la mediul septic de viață (*Herman*, 2005b-d). *Herman*, previziona faptul că, în viitor,

în unele cazuri de vitrocultură, fitoinoculii infestați (organele, țesuturile sau celulele) cu parteneri bacterieni sau fungici (în regim de culturi mono-, bi- sau polipartite), vor beneficia de o creștere și organogeneză mai bună, în plantele regenerate din astfel de culturi restricționându-se – la nivelul acestora – instalarea și răspândirea microorganismelor concurente, sau a celor fitopatogene, mai ales în momentul în care acestea vor fi trecute în condiții naturale de viață.

În practicile de culturi de țesuturi și celule vegetale, *coabitarea* plantelor cu o microfloră selectată se constituie într-o alternativă nouă de vitrocultură, procedură care deja prezintă implicații majore în agricultura modernă. De altfel, în biotehnologia vegetală, parteneriatul controlat – realizat între celulele și țesuturile plantelor, cu unele microorganisme – practicat în „sisteme deschise de cultură" (în recipiente neobturate), tinde să devină o nouă modalitate de creștere a fitoinoculilor, această procedură prezentând deja aplicații practice importante.

Un caz particular de *rizobiu* a fost descris de *Dreyfus* și colaboratorii (1988), la o leguminoasă tropicală denumită *Sesbania rostrata*, la care, în *nodulii* formați la nivelul tulpinilor, bacteria *Azorhizobium caulinodans* trăiește și manifestă o activitate azotofixatoare.

Nie (1983) și, ulterior, *Kennedy* și colaboratorii (1990, 1991), au descris existența unor paranoduli sau pseudonoduli și în rădăcinile unor specii neleguminoase. Acestea, vitrocultivate pe medii cu 2,4-D, în prezența unor bacterii azotofixatoare, manifestă o activitate de acest tip, formațiunile pseudonodulare deținând o constituție asemănătoare cu aceea a nodulilor descriși de *Dreyfus* și colaboratorii (1988), la *Sesbania*, fiind alcătuite dintr-o epidermă, cortex și endodermă, având în centru un mănunchi de vase conducătoare.

Începând din anul 1990, unele succese în direcția stabilirii de noi *asociații* simbionte au fost menționate ca fiind obținute de către *Al-Mallah* și colaboratorii, și de *Kennedy* și *Tchan* (1992), în urma tratării rădăcinilor de cereale – prealabil inoculării lor cu linii de *Rhizobium* – cu enzime hidrolizante, menite să biodegradeze parțial pereții celulari pectocelulozici ai acestora. În astfel de condiții, după un timp, în regim de vitrocultură, la nivelul rădăcinițelor – în procent de 10% – s-a remarcat formarea de structuri nodulare, nodozități care au manifestat capacități *azotofixatoare*. Pentru realizarea unor astfel de infecții, echipa lui *Al-Mallah* (1990) a labilizat structurile pereților celulari ai rădăcinilor de orez și de rapiță, cu un amestec de enzime pectocelulozo-hidrolizante, în prezența polietilenglicolului (PEG), ceea ce a facilitat încorporarea bacteriilor de *Rhizobium* în celulele radicu-

lare; cu toate acestea, în *cocultură*, activitatea nitrogenazică înregistrată în țesuturile acestor rădăcini a fost infimă.

Rezultate similare cu cele descrise anterior au fost obținute și de către *Benson* și colaboratorii (1990), pe culturi de rădăcini de grâu. Dar, se pare că, în cazurile menționate, formațiunile nodulare au deținut bacterii numai în spațiile intercelulare, nu și endocelular (*Preininger* și *Gyurján*, 2001).

În aceeași perioadă, *Chen* și colaboratorii (1991, 1992) au semnalat generarea – în cantități mici – de tumori nodulare la vitroculturile de rădăcini de grâu, infectate cu *Azorhizobium caulinodans*, formațiuni care au manifestat activitate nitrogenazică. Procentul de reușită în colonizarea vitrorădăcinilor de grâu sau de orez, aflate în cocultură cu *A.caulinodans*, a fost de 80%. Dar, în astfel de cazuri, localizarea bacteriilor *simbionte*, în paranodulii constituiți pe rădăcini nu a fost de tip endocelular, ci bacteriile au fost situate în spațiile intercelulare ale cortexului radicular (*Webster* și colab., 1997).

Capacitatea de a induce formarea *in vitro* de paranoduli a fost semnalată și în cazul altor bacterii *diazotrofe*, în afara celor *rizobiale*, în condițiile *cocultivării* rădăcinilor de grâu, crescute pe medii cu 2,4-D, împreună cu *Azospirillum*, un microorganism microaerofil (*Christiansen-Weniger*, 1992; *Katupitiya* și colab., 1995 și alții). Colonizarea vitroculturilor de rădăcini de grâu, cu tulpini de *Klebsiella*, sau de *Alcaligenes faecalis*, a condus la înregistrarea în țesuturile radiculare a prezenței unor procese de fixare a azotului atmosferic (*Wang* și colab., 1994).

Varga și colaboratorii (1994), în urma *cocultivării* unui calus de morcov, cu tulpini de *Azotobacter zettuovii*, pe medii lipsite de azot, au reușit să realizeze – la nivelul țesuturilor acestuia – o *asociere* stabilă între celulele fitoinoculului și bacteria simbiontă, *azotofixatoare*. Această asociație a putut fi menținută viabilă timp de 4 ani, periodic practicându-se repicarea repetată a calusului. Regenerarea de plante din astfel de calusuri s-a realizat după 8-10 luni de *cocultură*, dar numai după ce acestea au fost transferate pe medii care au avut în compoziția lor un conținut normal de azot. În spațiile intercelulare ale rădăcinilor plantelor regenerate la nivelul acestor calusuri s-a evidențiat prezența lui *Azotobacter*, în țesuturile lor determinându-se o activitate acetilen reductivă, ceea ce constituie o dovadă a existenței nitratreductazei în celulele radiculare.

Gyurján și colaboratorii (1995) au întreprins un experiment similar, efectuat cu culturi celulare de căpșun, aflate în *cocultură* cu bacteria *diazotrofă Azomonas insignis*. Cu toate că din celulele respective s-a reușit generarea de calus, care a conținut exemplare din bacteria *diazotrofă* cu care

BCU "BABEȘ-BOLYAI" UNIVERSITY LIBRARY

acesta s-a aflat în *cocultură*, din el nu s-au putut realiza regenerarea de plantule.

Sturz şi colaboratorii (1997) au inoculat rădăcini de trifoi roşu cu *Bacillus megaterium*, *Bordetella avium* sau cu *Curtobacterium luteum*, bacteriile fiind izolate din noduli radiculari. *Bacterizarea* a condus la o sporire semnificativă a creşterii vitroculturilor de trifoi, stimularea fiind şi mai însemnată atunci când în combinaţie au fost introduse şi tulpini de *Rhizobium leguminosarium* bv. trifolii. Formarea de noduli pe rădăcinile de trifoi a fost îmbunătăţită şi atunci când contaminarea acestora s-a făcut cu o combinaţie realizată între *R. leguminosarium* bv. trifolii şi *B. insolitus*, *B. brevis*, sau cu *Agrobacterium rhizogenes*, autorii ajungând la concluzia potrivit căreia asocierea în noduli a două sau a mai multor tipuri de bacterii – capabile să colonizeze ţesuturile acestora – stimulează activitatea *azotofixatoare* a lui *Rhizobium*, chiar şi numai prin realizarea unui amestec dintre *R. leguminosarium* bv. trifolii şi *R. leguminosarium* bv. phaseoli (*Herman*, 1997c).

O *endosimbioză* stabilă, artificial creată, a fost obţinută la rapiţă, prin formarea de paranodulii pe rădăcinile acesteia, în condiţiile colonizării vitroculturilor respective cu tulpini de *Pseudomonas caryophylii* (*Glagoleva* şi colab., 1996). După *Glagoleva* şi colaboratorii (1997), paranodulii formaţi pe rădăcinile de rapiţă, vitrocultivate pe substrat cu 2,4-D, infectate cu bacterii *azotofixatoare*, au fost diferiţi – morfologic şi structural – de cei generaţi în culturile efectuate pe mediu cu 2,4-D, dar care nu au fost colonizate cu bacterii.

Pe lângă cele arătate, s-a constatat că infecţiile cu *Pseudomonas* pot avea şi capacitatea de a stimula atât *rizogeneza*, cât şi *creşterea* vitroplantulelor. Astfel, minibutaşii uninodali de cartof, vitrocultivaţi în asociere cu tulpini aseptice de *Pseudomonas* sp., au înregistrat o sporire cu 196% a numărului de radicele secundare formate la nivelul bazei acestora (*Frommet* şi colab., 1991); totodată, *Nowak* şi colaboratorii (1995) au constatat – la vitroculturi de cartof, tomate, ardei, castraveţi şi de pepeni – nu numai o sporire a dezvoltării masei radiculare la nivelul vitroplantulelor regenerate din astfel de fitoinoculi, ci şi o mărire a numărului de lăstari neoformaţi din explante, concomitent cu o creştere a biomasei totale, şi o mai ridicată toleranţă a plantulelor la condiţiile de stres, în momentul transplantării lor „ex vitro".

Revenind la aspectele de *simbioză*, după părerea lui *Shantharam* şi *Matoo* (1997), în general, *rizobiile* inoculate pe rădăcini nu au dovedit a fi asociaţii funcţionale, întrucât pseudonodulii semnalaţi ca fiind formaţi în astfel de situaţii nu au sintetizat leghemoglobină sau nodulină.

În anul 1997 (a şi b), *Preininger* şi colaboratorii au obţinut, la căpşun, calus simbiont, azotofixator, prin efectuarea de *coculturi* ale acestuia cu

tulpini de *Azomonas*. Dar, pentru inducerea organogenezei la nivelul calusului *azosimbiont* a fost necesară suplimentarea mediilor de cultură cu azot. În examinările de electronomicroscopie, în cortexul peţiolurilor şi în mezofilul foliar al frunzuliţelor vitroplantulelor regenerate dintr-un astfel de calus, a fost evidenţiată prezenţa bacteriilor. Activitatea nitrogenazică a fost identificată nu numai în calus şi în vitroplantule, ci şi în exvitroplantule, postaclimatizarea acestora, după transferarea lor în sol.

Tot *Preininger* şi colaboratorii (1999) şi-au îmbunătăţit tehnicile de încorporare a bacteriilor *diazotrofe* în ţesuturile inoculilor cormofitici, prin utilizarea unor proceduri de „bombardare" a ţesuturilor cu microproectile de tungsten, încărcate cu *Azotobacter*, procedură folosită în practicile de transfer de secvenţe de ADN, efectuate în cazul experimentelor de inginerie genetică. „Bombardamentele" au fost administrate fie calusurilor primare, fie apexurilor caulinare. Bacteriile au rezistat bombardamentelor făcute cu o presiune a gazului – utilizat ca accelerator de particule – de 3kPa (30 bar). Această metodă s-a dovedit a fi mult mai eficientă în stabilirea de *asociaţii* artificiale, *azotofixatoare*, forţând o cormofită asimbiontă să dobândească capacitatea de a trăi în *simbioză* cu bacterii *diazotrofe*, administrate în regim de vitrocultură, situaţie în care localizarea bacteriilor a fost *extracelulară* (*Preininger* şi *Gyurján*, 2001).

Carletti şi colaboratorii (1998) au constatat că *bacterizarea* operată *in vitro*, în regim de *cocultură*, poate stimula *rizogeneza*. Cercetătorii menţionaţi au observat că, efectuând *coculturi* de lăstari de jojoba (*Simmondsia chinensis*), cu rizobacteria *azotofixatoare* Azopirillum *brasilense*, la nivelul acestora s-a reuşit o stimulare semnificativă a *rizogenezei*. Procedura a constat în creşterea explantelor de jojoba, timp de patru zile, pe un mediu cu adaos de AIB, în prezenţa lui *A.brasilense*; procedeul a fost urmat apoi de o transferare a lăstarilor pe un mediu de înrădăcinare, lipsit de regualtori de creştere. Această procedură a condus la scurtarea perioadei de iniţiere a procesului de rizogeneză şi la o sporire cu 45% a neogenezei de rădăcinişe. Această bacterie deţine şi capacitatea de a sintetiza şi de a excreta – în mediul ei de viaţă – compuşi asemănători fitohormonilor, cum ar fi cei de tip citochininic, giberelinic şi auxinic (*Cartelli* şi colab., 1994 şi 1995).

1.4.1.4.2. Coculturi *simbionte* realizate între fitoinoculi şi fungi (*micorizarea*)

La exvitroplantule, *simbioza* de tip *micorizal* se instalează în timp, ea lipsind la nivelul rădăcinişelor acestora, cu atât mai mult cu cât ele, cel mai adesea, în momentul transferării lor *ex vitro* sunt amplasate cu baza tulpini-

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

ţelor, înrădăcinate sau nu, într-un substrat steril (asepsizat în prealabil prin autoclavare), şi abia după un număr de săptămâni plantele aclimatizate sunt trecute într-un substrat septic, natural, de regulă în sol.

Plantulele generate *in vitro*, transferate *ex vitro*, în condiţii naturale, o perioadă de timp suferă de deshidratare şi de malnutriţie, rădăcinile lor fiind slab funcţionale, nereuşind să asigure acestora necesarul de apă şi de săruri minerale (*Cachiţă* şi colab., 2004). Pe de altă parte, reamintim că vitroplantulele – pe perioada cultivării lor *in vitro* – deţin o nutriţie heterotrofă sau mixotrofă, în vitrocultură ele beneficiind de un substrat bogat în nutrienţi, inclusiv în compuşi de natură glucidică. De menţionat este şi faptul că, substratul agarizat sau gelificat împiedică diferenţierea – la nivelul rizodermei – a perişorilor absorbanţi, ceea ce face ca *in vitro* rădăcinile să fie lipsite de zona piliferă, formaţiune morfoanatomică responsabilă, în principal, de îndeplinirea proceselor de absorbţie, la nivelul vârfurilor radiculare. În consecinţă, în momentul transferării *ex vitro* a plantulelor, postplantare, acestea suferă de un şoc multiplu, întrucât pe lângă suprimarea nutriţiei heterotrofe, în exvitroplantule se instalează un puternic deficit hidric, nu numai din cauză că rădăcinile lor nu au o conformaţie morfoanatomică completă, ci şi pentru că stomatele frunzuliţelor plantulelor abia scoase din *vitro* sunt nefuncţionale, ele având, în permanenţă, osteolele larg deschise. Deficitul hidric este amplificat şi de prezenţa la nivelul suprafeţei epidermei foliare şi caulinare a unei intense evapotranspiraţii, aceste celule – în general – fiind lipsite de cuticulă; în cazul în care cuticula este prezentă, ea este foarte subţire, discontinuă şi ineficientă. Acest tablou general, face ca mortalitatea exvitroplantulelor, în momentul transferării lor în condiţii septice, în primele zile de acomodare a acestora la regimul de viaţă specific mediului natural, să fie foarte ridicată. Într-o asemenea situaţie, administrarea unor preparate *micorizale*, care să corespundă cerinţelor adaptative ale cormofitelor cu care se operează, aplicate fiind în porţiunea radiculară a vitro- sau exvitroplantulelor, poate conduce la o creştere a procentului de supravieţuire al acestora, pe parcursul sau la finele aclimatizării lor la viaţa *ex vitro*, mărindu-se treptat capacitatea rădăcinilor de a-şi îndeplini, la cote normale, rolul lor fiziologic, pe măsură ce *simbioza* devine operantă. În acest mod, exvitroplantulele micorizate, în scurt timp, manifestă o mai mare rezistenţă la stresul biotic (inclusiv la cel de tip patogen) sau abiotic, îmbunătăţindu-se astfel performanţele funcţionale ale acestora, în special cele ale sistemului lor radicular, sporindu-i eficienţa, un prim câştig fiind acela al echilibrării balanţei hidrice, la nivelul oragnelor plantulelor (*Rhodes*, 1983).

În cadrul procedurilor de *biotizare*, *micorizarea* reprezintă o principală modalitate de *cocultură*. O astfel de asociaţie poate fi iniţiată fie în re-

gim de vitrocultură, fie în momentul transferării *ex vitro* a plantulelor generate în mediul aseptic. Procedurile folosite în cazul „însămânțării" fitoinoculilor cu fungi *micorizali* depind de natura vitroculturilor supuse unor astfel de tratamente și de tipul de substrat utilizat (*Trouvelot* și colab., 1986). *Simbioza*, odată instalată, aceasta va exercita un rol major în viața plantelor, mai ales în formarea și funcționarea sistemului radicular al speciilor lemnoase.

Inducerea artificială a procesului de *micorizare*, la nivelul materialului de plantat generat *in vitro*, în cadrul variatelor tehnici de micropropagare, se poate realiza pe mai multe căi, atât pe parcursul vitrocultivării fitoinoculilor, cât și în etapa de rizogeneză petrecută *ex vitro*, la începutul sau în decursul procesului de aclimatizare, ori după depășirea acestei prime etape, dar prealabil amplasării definitive a materialului de plantat, în teren.

În general, o condiție de bază în eficientizarea *simbiozei* constă în stabilirea unei permanente comunicări între partenerii implicați în aceaste raporturi, coabitarea de lungă durată presupunând menținerea unor bune relații, reciproc avantajoase, între organismele care alcătuiesc o *asociație* biologică.

Becard și *Fortin* au atras atenția, încă din anul 1988, că *mediul de cultură* adecvat compozițional asigurării unei optime evoluții a vitroplantulelor trebuie să dețină un conținut scăzut în săruri minerale și în zaharoză, întrucât numai un astfel de substrat va stimula creșterea miceliilor micorizale. Pe de altă parte, autorii considerau că în regim de vitrocultură se pot produce mutanții fungici, genotipuri nou formate având capacitatea de a stimula *rizogeneza*, chiar și la specii care în mod obișnuit nu au *ectomicorize*.

Fungul cel mai frecvent utilizat în inoculările practicate la nivelul variatelor exvitroplantule aparține genului *Glomus*, cu speciile: *G. epigaeum*, pentru meri, *G. mosseae*, *G. caledonium*, *G. clarum* și *G. versiforme*, pentru vița-de-vie, *G. mosseae*, *G. coronatum* și *G. caledonium*, pentru prun, *G. intraradices*, *G. geosporum* și *G. fistulosum*, pentru căpșun, *G. mosseae* pentru trandafir, *G. mosseae* și *G. intraradices*, pentru nuc și cu variate specii de *Glomus*, pentru păr, sau cu specii de *Gigaspora*, la vița-de-vie, cafea, ceapă etc. (*Rai*, 2001).

Gay și colaboratorii (1992; 1994), în scopul stimulării *rizogenezei* la nivelul bazei butașilor de *Cerasus avium* și de *Prunus cerasus*, au utilizat fungi *ectomicorizali*, respectiv mutante de *Hebeloma hiemale* sau de *H. cylindrosporum*, înalt producătoare de AIA. În acest mod, ei au marcat atingerea unui prag de 95% în eficientizarea înrădăcinării butașilor unor specii, care în mod natural nu prezintă sistem radicular *ectomicorizal*.

Vestberg și *Estaun* (1994) au emis punctul de vedere potrivit căruia, procedurile de *micorizare* trebuie selectate și adaptate, de la caz la caz, și de

la o specie la alta, avându-se în atenție nivelul atins de rizogeneză, rata de creștere a rădăcinilor, respectiv a vitroplantulelor, numărul de subculturi suportate de exvitroplantule, în momentul transferării lor *în natură* etc. Dar, în literatura de specialitate (*Wilkinson* și colab., 1994), se citează și faptul că, atât germinația semințelor, cât și creșterea plantulelor aflate în *simbioză* cu *micorizele*, în prezența unor linii bacteriene de *Pseudomonas fluorescens-putida* a fost stimulată.

Actualmente, se desfășoară o intensă activitate de cercetare științifică orientată în direcția selectării de fungi care să poată realiza *micorize*, chiar și cu specii vegetale cu care acestea, în mod obișnuit, nu formează astfel de *asociații*.

Calitatea și cantitatea inoculului cu care se face *micorizarea*, condiționează reușita operațiunilor de *micorizare* practicate atât *in vitro*, cât și în *in vivo* (*Vestberg* și *Uosukainen*, 1996). În general, după cum s-a dovedit în ultimul timp, inoculii inițiatori de *micorize* – *in vitro* sau *in vivo* – pot fi *hife*, *spori*, ori *rădăcini micorizate*, întregi sau fragmentate.

În cazul în care, pentru inițierea culturilor fungice sunt utilizați sporii, aceștia, în prealabil, trebuie triați prin centrifugare, procedura asigurând separarea sporilor sănătoși de cei îmbătrâniți, sau deteriorați; înainte de inoculare, sporii trebuie spălați – timp de un minut – într-o soluție de Tween 20, după care ei vor fi asepsizați (timp de 10 minute, la temperatura de 4^0C), cu o soluție de cloramină T 2%, în regim de agitare (metoda lui *Becard* și *Piche*, 1992); în final, dezinfectantul va fi îndepărtat de pe spori, prin spălare, și abia apoi aceștia vor fi inoculați *in vitro*.

Sporii, pregerminați *in vitro*, sau fragmentele de rădăcini *micorizate* (în care *micoriza* este funcțională), se constituie în inoculii care pot fi utilizați în scopul colonizării vitrorădăcinilor pe care dorim să le asociem cu fungii, în regim de *cocultură simbiontă*. Inoculul *micorizal* trebuie amplasat în preajma sistemului radicular al vitroplantulelor, de preferință în imediata apropiere a zonei de emergență a radicelelor secundare (*Rai*, 2001).

În scopul obținerii de culturi fungice pure, din rizosfera specifică plantelor care urmează să fie inoculate *in vitro* cu fungi micorizali, sau de la nivelul rădăcinilor speciilor vegetale care vor fi cultivate în regim aseptic, pe medii caracteristice lor, trebuie recoltate probe de sol. Eșantioanele de sol vor fi inoculate pe medii de cultură care să permită manifestarea optimă a variatelor categorii de microorganisme, respectiv de fungi; această operațiune trebuie repetată în timp, și ea va fi însoțită de o triere a coloniilor de microorganisme, etapă ce va fi urmată de o identificare a speciilor prezente la nivelul substratului de cultură aseptice, fază urmată de o subcultivare a variatelor mostre de material biologic, ori a eșantioanelor de sol, până când

se va ajunge la izolarea din probele aflate în cultură de suşe pure, ce după repetate biotestări vor servi, ulterior, în efectuarea studiilor de biotizare. Deci, *micorizarea* practicată *in vitro*, pe fitoinoculi, vizează cunoaşterea aspectelor referitoare la izolarea din rizosfera naturală a fungilor *micorizali* specifici variatelor tipuri de plante.

Culturile pure, odată realizate, trebuie inoculate pe rădăcini vitrocultivate, fie în sistem *dual*, pentru ca într-o primă fază să se opereze inocularea fungilor în apropierea rădăcinilor la nivelul cărora se doreşte realizarea unui prim complex *micorizal* sau *bacterizal*, fie – în cazul fungilor arbusculari – prin infestarea bazei vitroplantulelor (cultivate fiind pe substrat aseptic) cu arbuscule rezultate dintr-o precultură precedentă, fie cu fragmente radiculare care deţin astfel de formaţiuni *simbionte*. În acest mod, se realizează un sistem *bipartit* sau *tripartit* de simbiocultură (*Elmeskaoui* şi colab., 1995). Astfel, în *coculturile bipartite* sau în cele *tripartite*, pentru a forţa instalarea nutriţiei autotrofe la nivelul vitroplantulelor aflate într-un sistem aseptic, în recipientele de cultură trebuie ridicată concentraţia de CO_2, procedură în urma căreia hifele ce vor coloniza rădăcinile vor beneficia de o mai bună aprovizionare a lor cu nutrienţii rezultaţi din fotosinteză, compuşii organici sintetizaţi de către vitroplantule, şi cedaţi agenţilor simbionţi, constituindu-se într-o condiţie de bază pentru ca *biotizarea*, respectiv *micoriza*, să fie funcţională şi eficientă în satisfacerea cerinţelor vitale ale ambilor parteneri. Administrarea componentelor *micorizale* se poate face şi prin aplicarea acestora în zona bazală a exvitroplantulelor, în momentul plantării lor într-un substrat septic.

După cum subliniau *Elmeskaoui* şi colaboratorii (1995), în *biotizare* trebuie să se aibă în vedere şi faptul că, în compoziţia mediilor de cultură se impune utilizarea de substanţe variate, potrivite cu *cerinţele fiecărui partener* implicat în *sistemul simbiont*, precum şi că trebuie adoptate acele proceduri de vitrocultivare care să fie convenabile desfăşurării optime a proceselor biologice ale diferiţilor vitroinoculi, atât a celor *cormofitici*, cât şi a celor *fungici* (*micorizali*) sau *bacterieni*. Acest lucru este necesar cu atât mai mult, cu cât mediul de cultură *Murashige-Skoog* (1962) deţine concentraţii ridicate de sulfat de sodiu, de fosfor şi de zaharoză, substanţe care nu corespund cerinţelor mediilor de cultură destinate creşterii microorganismelor. Acest fapt face ca, în etapa realizării de culturi *bi-* sau *tripartite*, la nivelul rădăcinilor colonizate cu fungi *micorizali*, arbusculari, în asociere cu bacteriile, este indispensabilă operarea de modificări în compoziţia substratului comun de cultură, astfel încât acesta să corespundă, din punct de vedere chimic şi fizic, cerinţelor tuturor partenerilor aflaţi în cocultură. Pentru

aceasta, în prealabil, în acest domeniu trebuie efectuate studii biologice profunde şi complexe.

Lovato şi colaboratorii (1995; 1996) au fost de părere că, într-un viitor apropiat procedurile artificiale de *simbioză* vor avea în vedere colonizarea rădăcinilor cu un *inocul combinat*, *tripartit*, denumit de ei „integrat", realizat între un *fung micorizal* şi *rizobacterii*, *asociaţie* capabilă să stimuleze nu numai creşterea plantelor, ci să asigure şi o protecţie a acestora împotriva unor agenţi fitopatogeni nedoriţi, prezenţi în mod normal, natural, în rizosferă. Pentru *micorizare*, ei au recomandat utilizarea unor inoculi de tip *vezicular-arbuscular*, care să fie administraţi la nivelul sistemului radicular al exvitroplantulelor, în momentul aclimatizării acestora la mediul de viaţă septic, tehnologia îmbunătăţind procedurile de obţinere pe scară industrială a materialului de plantat, mai ales a celui aparţinător speciilor lemnoase, de exemplu la platan, citrice, viţei-de-vie, şi altele. În acest scop, ca şi cale de vehiculare a *rizobacteriilor* în rădăcinile plantelor, *Bianciotto* şi colaboratorii (1996) au utilizat fungii *micorizali*, *arbustiformi*.

Efecte favorabile exercitate de către unele bacterii, asupra relaţiei plantă-fung, au fost observate mai ales în cazul germinării în regim *simbiont* a seminţelor de orhidee. Astfel, la orhidee (a căror viaţă este strâns legată de *micorize*, încă din faza de germinaţie), experimentele au dovedit că, inocularea în regim de *cocultură* a seminţelor încolţite în mediu aseptic, în prezenţa fungilor *micorizali* izolaţi de pe rădăcinile plantelor crescute *in situ* (asociate fiind cu anumite bacterii autotrofe), a exercitat un impact benefic nu numai asupra germinării acestora, ci a stimulat, totodată, şi creşterea embrionilor, favorizând o mai bună dezvoltare a plantulelor rezultate din ei (*Gorst*, 1996). *Germinaţia simbiontă* a seminţelor de orhidee, în prezenţa unei bacterii endotrofe, a determinat o sporire a creşterii plantelor, întrucât bacteria se pare că intermediază procesul de recunoaştere dintre orhidee şi fungul *micorizal* şi, pe de altă parte, ea produce sau stimulează sinteza de AIA în celulele de orhidee.

Martins şi colaboratorii (1996) au efectuat cercetări de *ectomicorizare* a zonei radiculare a exvitroplantulelor de castan (*Castanea sativa* Mill), cu hife de *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata*, *Piloderma croceum* şi de *Pisolitus tinctorius*. Cele mai bune rezultate, în supravieţuirea acestora şi în evoluţia lor, în ceea ce priveşte aspectul plantelor şi a parametrilor fiziologici atinşi de ele, s-au remarcat mai ales la plantulele *colonizate* cu hife de *Pisolitus tinctorius*.

Inocularea vitroplantulelor de *Populus deltoides*, cu fungi *ectomicorizali*, de tipul: *Paxillus involutus*, *Pisolitus tinctorius*, *Laccaria laccata* sau cu *Cenococcum geophilum*, a condus la înregistrarea unor reuşite în *coloni-*

zarea rădăcinilor cu hifele ciupercii *simbionte*, dar numai în cazul fungului *Paxillus involutus*, situație în care s-a obținut o bună răspândire a hifelor în substrat; la celelalte genuri fungice cu care s-a experimentat, tentativele au eșuat. Totodată, în regim de vitrocultură, plantulele de plop *ectomicorizate* au prezentat o creștere sporită atât a taliei, cât și a greutății uscate a acestora (*Reddy* și *Satyanarayana*, 1998).

Grange și colaboratorii (1997), studiind efectele exercitate de diferitele genotipuri de *Hebeloma cylindrosporum*, asupra înrădăcinării minibutașilor de *Prunus avium* și de *P. cerasus*, în regim de vitrocultură, au înregistrat – la nivelul acestora – o mărire a capacității *rizogene*, crescând, totodată, până la 100% procentul de supraviețuire a extravitroplantulelor. În consecință, în micropropagarea practicată prin intermediul procedurilor combinate de tratare a materialului de plantat generat *in vitro*, sau după transferarea *ex vitro* a acestora, cu mutante fungice de *H. cylindrosporum*, înalt producătoare de AIA (administrându-le la bază preparatele micorizale de acest tip), a condus la obținerea – la baza vitroplantulelor – de rădăcini de calitate superioară. În cazul neadministrării de tratamente de *micorizare*, supraviețuirea exvitroplantulelor a atins un procent de doar 30%, cauza morții plantulelor transferate *ex vitro* fiind slaba dezvoltare și funcționare a sistemului radicular al acestora.

În urma experimentelor efectuate de *Rudawska* și *Kieliszewska* (1997), cu vitroplantule de *Pinus sylvestris* inoculate, cu o linie mutantă a fungului *Paxillus involutus* (deținător al unei capacități ridicate de sintetiză a AIA), s-a ajuns la o substanțială sporire a *rizogenezei*, comparativ cu situația în care *micorizarea* zonei radiculare a vitroculturilor a fost făcută cu linii nemutante ale ciupercii respective. În general, stimularea dezvoltării sistemului radicular, prin *micorizare* – mai ales cu linii fungice înalt sintetizatoare de AIA – a produs o considerabilă stimulare a creșterii exvitroplantulelor.

Douds (1997) a demonstrat că o *cocultură tripartită*, realizată între rădăcinile de morcov – transformate în rădăcini firoase, prin tratamente cu *Agrobacterium rhigogenes* – cu *vezicule-arbusculare*, *micorizale*, de *Glomus mosseae*, a scos în evidență faptul că doar 14% dintre culturile *asociate*, astfel realizate, au fost funcționale.

În cazul *biotizării* unei *coculturi tripartite*, de plantule de zmeur – rezultate dintr-o micropropagare a acestora în prezența lui *Agrobacterium radiobacter* – prin vitroasocierea fitoinoculilor cu *vezicule-arbusculare*, *micorizale*, de *Glomus mosseae*, după două luni de vitrocultură s-a înregistrat o sporire cu 40% a creșterii vitroplantulelor; postaclimatizare, procentul lor de supraviețuire a fost de 100%. În plus, plantele *biotizate*, transplantate în

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

substrat contaminat cu *Phytophthora fragariae* var. Rubi (pe durata a 11 săptămâni), au prezentat o completă protecție fitosanitară a acestora (*Herman*, 2004a).

În scopul măririi vitezei de creștere a plantelor obținute prin tehnici de micropropagare *in vitro*, și a dobândirii de către acestea a unei capacități sporite de supraviețuire, în momentul transferării lor *ex vitro*, în ultimii ani s-au descris forme noi de *asociații* stabile, posibil de realizat între rădăcinile plantelor și fungii imperfecți (*Deuteromycotina*). Astfel, în literatura de specialitate sunt menționate circa 600 specii de plante (care corespund la 320 de genuri, respectiv la 100 de familii), ce pot beneficia de *simbioze* de acest tip. Această categorie de fungi suportă foarte bine cultivarea lor pe medii artificiale (*Jumpponen* și *Trappe*, 1998).

Von Alten (1998) a semnalat, și el, faptul că în sistemul radicular al unor plante de cultură, linii de *Bacillus mycoides* și de *Pseudomonas fluorescens* au promovat formarea de *micorize arbusculare*. Pe de altă parte, *Siddiqui* și *Mahmood* (1998) au dovedit că, la tomate, o combinație realizată între fungul *Glomus mosseae* și bacteria *Pseudomonas fluorescens* a condus la o stimulare a creșterii plantelor, rezultatele obținute, și în acest caz, fiind superioare valoric parametrilor înregistrați la culturile de tomate în care partenerii respectivi au fost utilizați separat. În schimb, la mazăre, o interacționare dintre bacteriile *Pseudomonas fluorescens* și *Rhizobium leguminosarum* (bacterie azotofixatoare, prezentă în nodozitățile rădăcinilor speciilor de leguminoase), cu fungii *micorizali arbusculari*, a condus atât la sporirea numărului de nodozități neoformate pe rădăcini, cât și la o mărire a dimensiunii lor, și o intensificare a pigmentării acestora.

Tulpinile de *Rhizobium* și vezicule-arbusculare fungice, *micorizale*, de *Glomus*, sunt agenții *simbionți* obișnuiți ai plantelor de salcâm (*Robinia pseudoacacia*). *Balla* și colaboratorii (1998) au adus dovezi experimentale în sprijinul ideii că, o simbioză *tripartită* realizată între cele două componente de *biotizare*, la nivelul plantulelor de salcâm micropropagate *in vitro* – în momentul amplasării acestora *ex vitro* – a fost benefică, întrucât această simbioză a sporit atât creșterea masei vegetative a plantelor, cât și procentul lor de supraviețuire, fapt resimțit chiar și după un an și jumătate de la transferarea exvitroplantulelor în sol. Surprinzător a fost și faptul că, inocularea exvitroplantulelor exclusiv cu tulpini de *Rhizobium* a favorizat adaptarea acestora la viața *ex vitro*; în decursul aclimatizării, însă, procentul de supraviețuire, creșterea plantelor și talia acestora, au depins de natura tulpinii de *Rhizobium* utilizată în asociația *simbiontă*. În schimb, experimentele au dovedit că inoculările efectuate exclusiv cu vezicule arbusculare de *Glomus* au condus – în primii ani de viață ai plantelor – la moartea plantelor, doar *sim-*

bioza tripartită fiind eficientă în obținerea de rezultate cert favorabile. În cazul aplicării infecțiilor cu *Glomus* se impune, însă, luarea de măsuri suplimentare care privesc, în primul rând, alegerea cu atenție a momentului în care este administrat tratamentul de biotizare și, în al doilea rând, preselectare în laborator a celei mai compatibile tulpini de *Glomus*, adecvată scopului urmărit (*Herman*, 1998g).

Deși, fungii *micorizali* pot fi cultivați *in vitro*, miceliul lor subcultivat fiind o lungă perioadă de timp ca atare, solitar, pe medii artificiale, poate suferi o reducere a capacității lui de infecțiozitate. Astfel, *Wenkart* și colaboratorii (2001) au realizat o cultură de rădăcini firoase de *Cistus incanus*, modificate cu *A. rhizogenes*, pe care le-a infectat cu un fung *micorizal* natural, simbiont, respectiv cu *Tuber melanosporum*. Hifele acestuia au putut fi cultivate timp de șapte luni pe un mediu solid, propice – ca și compoziție chimică – creșterii rădăcinilor firoase. Ulterior, subcultivarea fungului *micorizal* a putut fi realizată timp îndelungat, numai dacă cultura a fost practicată în prezența fragmentelor de rădăcini *simbionte*, specifice. Această *asociație micorizală* se pretează atât la micropropagare, cât și la realizarea unui parteneriat *simbiont* stabil, la nivelul *exvitroplantulelor*.

Un colectiv condus de *Declerck* (2002) a experimentat cu formațiuni arbusculare, *micorizale*, de *Glomus intraradices*, administrate vitroplantulelor de banan. Ei au studiat influența exercitată de către arbuscule inoculate fiind *in vitro*, sau în condițiile încorporării lor în solul nesterilizat sau sterilizat, substrat în care au fost amplasate exvitroplantulele în perioada de aclimatizare a acestora la condițiile mediului septic. Ca lot martor, în întreg experimentul, au servit exvitroplantulele *nemicorizate*, cultivate în soluri similare ca și compoziție și structură. Cele mai importante creșteri ale plantelor de banan au fost înregistrate în cazul amplasării exvitroplantulelor într-un sol pasteurizat, inoculat – după răcire – cu fungul arbuscular, *micorizal*, menționat anterior, produs monoxenic, *micorizarea* sporind atât creșterea tulpinilor, cât și înrădăcinarea plantulelor de banan.

Cu toate că *veziculele-arbusculare*, *micorizale*, nu pot fi crescute ca atare, pe medii sintetice, *asocierea* lor în *cocultură* cu fitoinoculii poate fi realizată cu succes. Singurele dificultăți întâmpinate au constat în identificarea condițiilor optime de vitrocultură, care să asigure atât germinarea sporilor și creșterea hifelor, cât și aceea a țesuturilor vegetale, cu realizarea de *simbioze* stabile și eficiente.

Preocupați de elucidarea fenomenelor prin care *ectomicozele* stimulează *rizogeneza* și creșterea rădăcinilor, în regim de vitrocultură – ca urmare a producerii de către fungii respectivi a unui supliment de AIA nativ – *Niemi* și colaboratorii (2002a și b) au studiat măsura în care hifele de *Pi-*

solithus tinctorius şi cele de *Paxillus involutus* manifestă capacitatea de a stimula rizogeneza şi creşterea rădăcinițelor adventive regenerate pe fragmente de hipocotile de pin, cultivate *in vitro*. Din experimente a reieşit şi faptul că, cele două genuri fungice manifestă capacități diferite de influențare a sintezei de AIA, filtratul de mediu şi miceliul de *Pisolithus tinctorius* conținând o cantitate mai mare de AIA (liber sau conjugat), în raport cu producția de auxină identificată în prezența hifelor de *Paxillus involutus*. Dar, în cazul lui *Pisolithus tinctorius* neogeneza de rădăcini adventive a fost mai redusă decât în situația administrării sau a creşterii fragmentelor de hipocotile în prezența fungului *Paxillus involutus*, fapt care i-a condus pe autori la concluzia potrivit căreia nu numai AIA-ul sintetizat de fungi a fost factorul rizogen, ci la producerea acestui fenomen au concurat şi alți compuşi, încă necunoscuți, elaborați de către hifele ciupercii, presupunând că impulsionarea creşterii s-ar datora poliaminelor sintetizate de hife, chiar şi atunci când *ectomicorizele* nu sunt încă vizibile. Dintre cei doi fungi ectomicorizali utilizați de experimentatori, doar hifele de *Paxillus involutus* au generat un nivel mai ridicat de *spermidină* şi de *putresceină*, iar elaborarea de *diamine* de către hifele ciupercilor *ectomicorizale* a depins de tipul tulpinilor fungice implicate în *micorize*.

Tot în anul 2002, *Niemi* şi *Häggman* au publicat o lucrare în care au dezbătut aspecte referitoare la inabilitatea embrionilor somatici de pin (*Pinus sylvestris*) de a încolți în absența fungului *ectomicorizal Pisolithus tinctorius*. Însă, prin adăugarea acestui miceliu în vitrocultură s-a reuşit provocarea germinației embrionilor somatici, efectul fiind condiționat, însă, de păstrarea unei anumite distanțe între embrion şi hifele fungului. Dacă bucățile de agar, care conțineau hifele fungice, au fost amplasate foarte aproape de embrioni, sau chiar i-a atins, pe medii cu concentrații ridicate de zaharoză hifele au crescut şi s-au extins peste embrioni, sufocându-l; dacă, însă, concentrația glucidului în substratul de cultură a fost scăzută, în cazul hifelor situate la o oarecare distanță de embrioni s-a ajuns ca cele două organisme să interacționeze, demarându-se germinația acestora, grație producției de AIA sau de *cadaverină*, compuşi elaborați şi eliberați de miceliul simbiont în substratul comun de cultură. Totodată, inocularea *ex vitro* a plantulelor de pin cu miceliu de *Pisolithus tinctorius*, în momentul aclimatizării lor la mediul septic din seră, a îmbunătățit evoluția plantulelor rezultate din embrionii somatici care au beneficiat de *micorizare*, fungul susținând creşterea acestora, cu condiția ca tulpina micelială să fie compatibilă, din punct de vedere biologic, cu fitoinoculii. Acțiunea benefică a fungului micorizal a fost evidentă, cu toate că formațiunile *micorizale*, macroscopic, nu au fost vizibile.

Pe lângă cele arătate, *Yao* și colaboratorii săi (2002), de la Universitatea Laval din Quebec (Canada), au descoperit că prin inocularea plantulelor de cartof, provenite din vitrocultură, cu vezicule-arbusculare *micorizale* de *Glomus*, în momentul plantării lor în seră s-a realizat o protecție a acestora împotriva atacului fitopatogen exercitat de *Rhizoctonia solani*, rezistența fiind mai eficientă în cazul *micorizei* stabilite între plantele de cartof și hifele de *G.etunicatum*, decât în situația în care inoculii de cartof au fost cocultivați în prezența veziculelor de *G.intraradices*. În plus, infecția *micorizală* cu *G.etunicatum* a condus la o mai bună creștere a plantelor, precum și la o sporire a producției de tuberculi. Potrivit literaturii de specialitate (*Herman*, 2002), s-a dovedit că veziculele *micorizale* pot îmbunătăți capacitatea de apărare a cartofilor, plante care, altfel, sunt deosebit de sensibile la atacul fungilor fitopatogeni.

Din cele arătate a rezultat faptul că, *biotizarea* plantelor micropropagate în scop comercial, efectuată la baza exvitroplantulelor sau încorporată în substratul de cultură, *favorizează* formarea unei *rizosfere* care nu numai că *îmbunătățește* vigurozitatea acestora, și ridică procentul lor de supraviețuire, dar asigură și o *protecție* a plantelor împotriva infestării sistemului lor radicular cu variați agenți fitopatogeni.

Gianinazzi și colaboratorii (2003) au conceput un substrat, constând din 2% inocul arbuscular, *micorizal*, în care au fost încorporate plantule de *Cynara scolymus*, micropropagate industrial; procentul de supraviețuire al acestora a fost de 98%, cu 10% mai ridicată decât în cazul lotului de exvitroplantule la care această procedură nu a fost utilizată; după amplasarea plantelor *micorizate* la locul definitiv de viață, productivitatea culturilor, în teren, a crescut cu 27%. Din punctul de vedere al autorilor, efectul economic justifică cheltuielile de *micorizare* (*Herman*, 2004a).

Balla și colaboratorii (2003) au *biotizat* plantule de piersic, prun, plop și de salcâm, cu *micorize* selectate. Ei au constatat că, din momentul micorizării lor, fungii au exercitat un rol semnificativ pozitiv, asupra creșterii plantelor, cu precădere la piersic. Atunci când inocularea a fost făcută înainte ca exvitroplantulele să fie aclimatizate, acțiunea a încetinit dezvoltarea acestora, probabil din cauză că plantulele transferate în condiții nesterile nu tolerează inocularea *micorizală*, procedura care s-a aplicat în solul amestecat cu rădăcini de trifoi alb, deținător de arbuscule cu fungi *micorizali* (*Herman*, 2004a).

Un colectiv de cercetători din Spania (*Padilla* și colab., 2006), în scopul măririi de la 24% la 75-85% a procentului de supraviețuire al exvitroplantulelor de *Pouteria lucama*, după transferarea acestora *ex vitro*, au cocultivat plantulele în zona lor radiculară fie cu spori sau cu hife de

Glomerus intraradices, fie cu fragmente de rădăcini de *Trifolium pratense*, inoculate cu arbuscule micorizale, împreună cu bacteriile asociate rădăcinilor respective, sau numai cu un filtrat obținut din zona rădăcinilor de trifoi, conținând bacterii din sol (*Herman*, 2006a). Atât în cazul tratamentelor efectuate numai cu filtratul bacterian, cât mai ales a coculturii combinate de *micobacterizare*, la 4 luni de la transferarea plantelor în seră masa foliară și cea radiculară (inclusiv greutatea proaspătă a acestora) a fost mult crescută.

Cu toate că, în domeniul biotehnologiilor vegetale vitroculturile combinate, respectiv *asociațiile* posibil de realizat între microorganismele *simbionte* și fitoinoculi, au fost mai puțin abordate de către cercetătorii români, în ultimii ani – grație reintrării în actualitate, pe plan mondial, a studiilor axate pe probleme de fitopatologie, în regim de vitrocultură – un număr restrâns de specialiști din domeniul biotehnologiei vegetale, din țara noastră (*Maximilian* și colab., 1999; 2000; 2002; 2004), și-au orientat cercetările înspre studierea unor aspecte fundamentale legate de *micorizare*. Detalii cu privire la biotehnologiile axate pe tehnici de *micorizare*, precum și referitoare la natura interacțiilor stabilite între celulele vegetale și celulele fungice, pot fi găsite în lucrările lui *Maximilian* și colaboratorii (1998; 2002; 2004).

Colectivul condus de *Maximilian* s-a preocupat de elucidarea unor aspecte referitoare la interrelaționarea celulelor vegetale cu unii agenți fitopatogeni și simbionți, studiile fiind făcute pe material provenit din experimente de cocultură (1998; 2002; 2004). Interesante sunt studiile ultrastructurale, efectuate de către colectivul amintit, în care se relevă detalii cu privire la interacția dintre celulele cormofitice și cele ale microorganismelor, dar și cele de colorație vitală, sau investigațiile calitative și cantitative, cu referire la activitatea de natură enzimatică intervenită la nivelul partenerilor implicați în astfel de interacții.

Maximilian și colaboratorii (2004) au studiat și aspecte privitoare la identificarea și relevarea metodelor de investigare a viabilității hifelor fungice, prin tehnici de citochimie, practicate prin intermediul coloranților vitali. Cele mai utilizate metode, în tehnicile de specialitate, de această natură sunt cele de colorare a fungilor *micorizali* fie cu soluție de *negru de clorazol*, fie cu *albastru de tripan*. Cercetările au fost făcute pe vitrorădăcini de viță-de-vie și de porumb, colonizate cu *micorize fungice* din genul *Glomus*. Pe lângă aceasta, reacțiile de colorație vitală au facilitat atât localizarea hifelor fungice în structurile anatomice, radiculare, cât și diferențierea, în cadrul țesuturilor radiculare gazde a hifelor metabolic active de cele inactive.

Studiile citohistochimice au oferit și posibilitatea efectuării unei evaluări a eficienței „colonizării" cu hife *micorizale* a țesuturilor radiculare, fa-

cilitând localizarea acestora și permițând analizarea formelor morfologice pe care le generează talul fungic.

Observațiile de microscopie optică au permis evidențierea în câmpul vizual a sporilor fungici, germinarea acestora și invadarea cu hife a celulelor cortexului radicular; totodată, s-a reușit identificarea arbusculelor, ramificarea hifelor (aflate în diferite stadii de dezvoltare), precum și prezența și localizarea veziculelor acestora etc. Cercetările colectivului amintit au scos în evidență și că, înmulțirea și răspândirea micelilului fungic, în rădăcinile gazde, s-a produs numai în țesutul cortical al acestora, nu și în alte structuri histologice, cum ar fi în rizodermă sau în hipodermă, ori în exodermă. Autorii au constatat că, hifele fungilor *micorizali* se dezvoltă în paralel cu axul rădăcinii, ele alungindu-se fără să se ramifice, generând asocieri (gheme), fie ramificându-se și interconexându-se cu punți în formă de H (*Maximilian* și colab., 2004). Ramificările hifelor fungice pot fi și de tip dihotomic, încolăcirea acestora dând naștere la structuri arbusculare, ce se constituie mai ales în zona de pătrundere a acestora în celula vegetală. Veziculele (fig. 12) au rol în depozitarea substanțelor de rezervă ale fungului, diferențierea acestora având loc după formarea primei arbuscule, constituirea lor finalizându-se în momentul în care arbusculele intră în senescență (*Maximilian* și colab., 2002; 2004).

Din articolele publicate de către colectivul condus de *Maximilian* (2002; 2004) a rezultat și faptul că, hifele fungice pot fi răspândite în spațiile intercelulare ale țesutului radicular, fie ele pătrund în lumenul celulelor (fig. 13). Hifele fungice pot fi opace, sau transparente, în dependență de statutul lor funcțional; hifele opace sunt mai active din punct de vedere metabolic, în timp ce cele transparente prezintă un conținut celular hilar, citoplasma lipsind sau fiind într-un avansat stadiu de dezintegrare ultrastructurală. În timp, colonia veziculo-arbusculară suferă un proces de degradare, iar lizatele fungice – în cazul în care celula gazdă se menține viabilă – sunt eliberate în partenerul cormofitic, oferindu-i acestuia nutrienți prezenți în veziculele și hifele deținute de hifele simbionte. Evidențierea cito- și histochimică a *fosfatazelor* alcaline și acide, precum și a *succindehidrogenazelor*, a permis observarea hifelor în țesuturi, și evaluarea activității metabolice în zonă.

După *Maximilian* și colaboratorii (1998), *fosfatazele solubile* evidențiază implicarea fungului în metabolismul fosforului. Activitatea maximă a fosfatazelor acide și a celor alcaline se manifestă în etapa inițială de instalare a simbiozei *micorizale* în rădăcină, fază în care hifele aprovizionează cu polifosfați celulele parenchimului radicular, mai ales în zonele în care accesul acestor compuși este mai deficitar; în faza de colonizare fungică, în

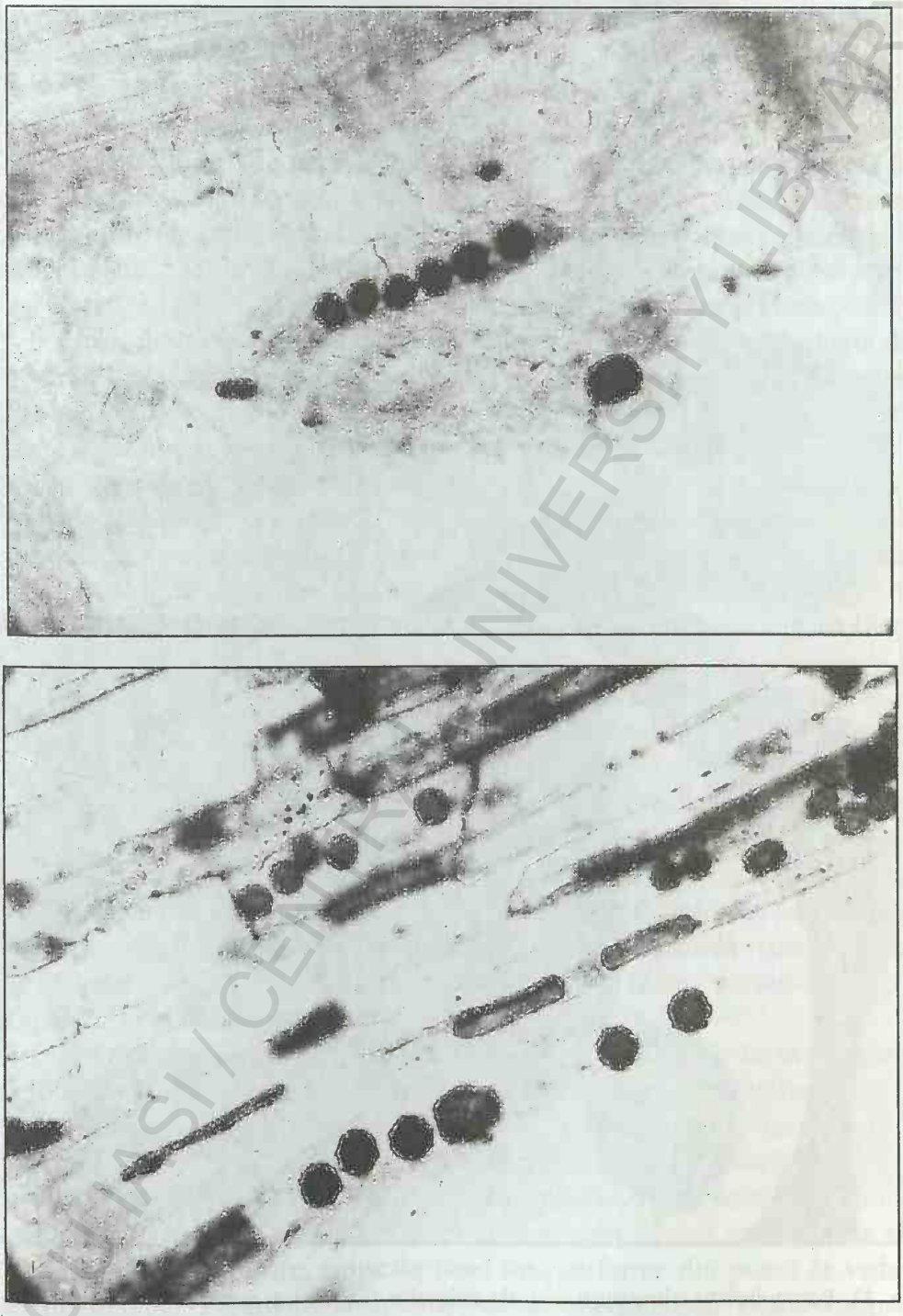
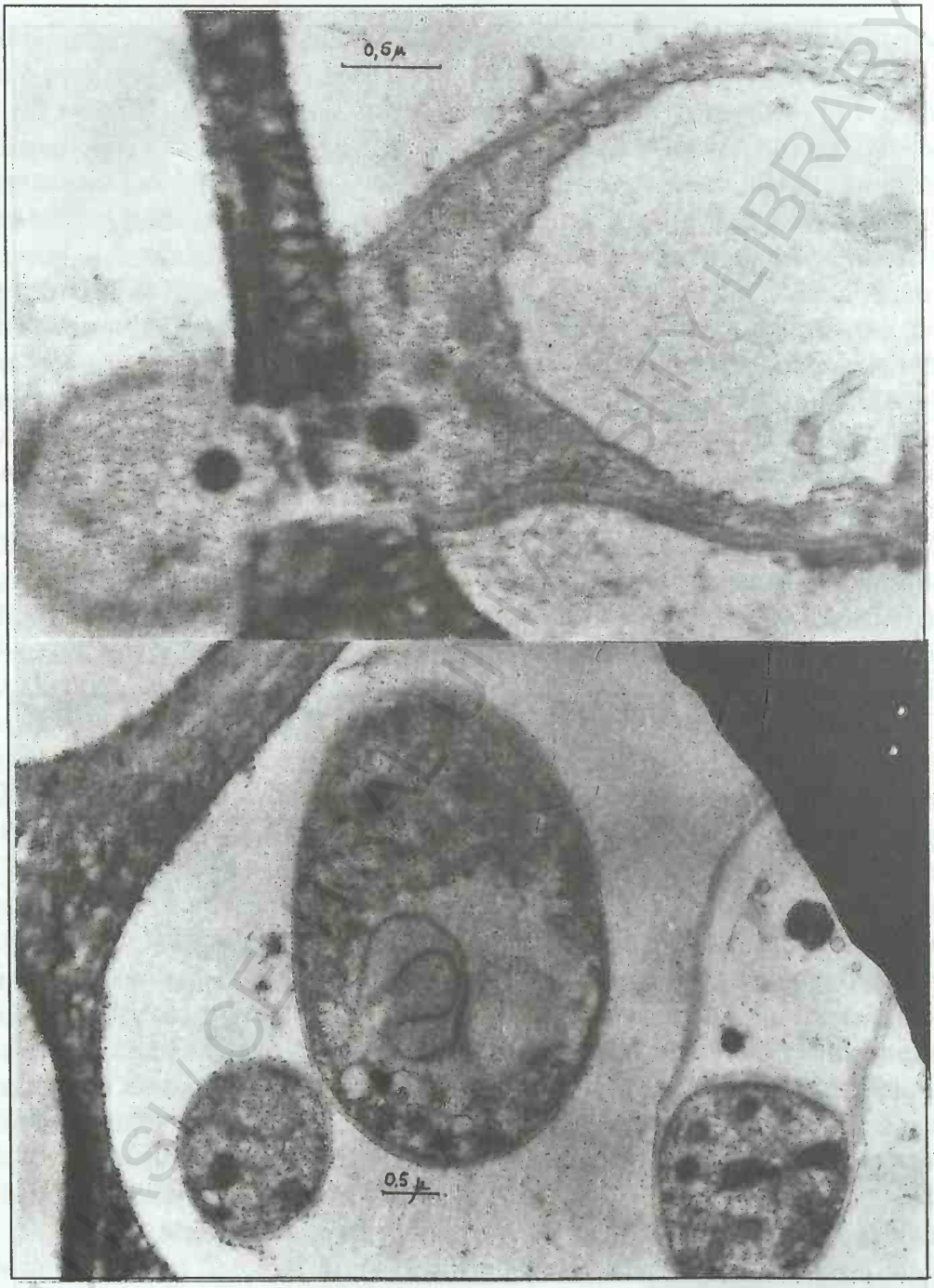


Fig. 12. Vezicile fungice de micorize, colorate cu negru de clorazol, aspecte evidențiate în celula radiculară (magnitudine 200) (*Maximilian* și colab., 2002).

BUCHAREST / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Fig, 13. Particularități ultrastructurale ale celulelor fungice ce penetrează peretele celulei vegetale și stabilesc endomicorize (*Maximilian* și colab., 2002).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

spectrul electroforetic al fosfatazelor solubile s-a semnalat apariția unei noi benzi cu activitate la pH 4 și 8,5.

Pe lângă fosfataze, *esterazele* se constituie în markeri care reflectă cu multă sensibilitate diferitele stări fiziologice și metabolice prin care trec relațiile de *simbioză* ale partenerilor implicați în etapele de progresare a fazelor infecționale și de echilibrare a noilor situații interrelaționale create. Astfel, tot în faza timpurie de instalare a simbiozei s-a remarcat sinteza în celule a două izoesteraze noi, care pe măsura avansării colonizării *micorizale*, și a creșterii plantelor, treptat sunt inactivate (*Maximilian* și colab., 2004).

În atenția colectivului de cercetători de la Institutul de Biologie din București a stat și analizarea activității *peroxidazice*, precum și a spectrului izoenzimelor evidențiate în complexul fungic, *simbiont* (țesut parenchimatic colonizat cu fungii micorizali).

Peroxidazele fiind enzime cu o activitate fiziologică și metabolică deosebit de complexă (*Penel*, 1992), acestea joacă un rol major și în procesele de apărare ale plantelor împotriva acțiunilor stresante, printre altele menționăm cele care țin de protecția plantelor atacate de către agenții fitopatogeni. În cazul *simbiozei* de tip *micorizal*, activitatea peroxidazică (după *Maximilian* și colab., 2004) este crescută, datorită rolului jucat de aceasta în oxidarea fenolilor și în formarea chinonelor, compuși implicați în inhibarea activității fitopatogenilor; dar, spectrul izoperoxidazelor, în cazul celulelor parenchimatice colonizate cu fungi micorizali, a fost similar cu cel identificat în țesuturile radiculare ale lotului control, neinfectate cu fungi sau cu alți agenți *fitopatogeni*. Acest fapt explică de ce relația de tip *simbiont* diferă de aceea de tip *fitopatogen* (*Maximilian* și colab., 1998). În schimb, în spectrul electroforetic al *catalazei*, după colonizarea parenchimului radicular cu fungii *micorizali* de *Glomus*, temporar a apărut o nouă bandă izoenzimatică, care indică că această formațiune poate fi apreciată ca un marker al reacției de apărare a celulelor gazdă (*Maximilian* și colab., 2004).

Maximilian și colaboratorii (2004) au specificat că, la exvitroplantulele lotului nemicorizat procentul de supraviețuire, postaclimatizare (după 6 săptămâni), a fost de circa 46%, în timp ce la lotul colonizat cu fungi *micorizali* supraviețuirea a fost de 75%. În plus, plantele *micorizate* au fost mai viguroase, sistemul lor radicular a fost mai bogat, rădăcinile simbionte fiind mai lungi și mai ramificate, ceea ce a crescut înzecit suprafața de absorbție a masei radiculare, culturile fiind mai uniforme din punct de vedere morfofiziologic. Parametrii morfometrici și gravimetrici, biometrizați la plantele de viță-de-vie colonizate cu fungi *micorizali* din genul *Glomus*, la 8 săptămâni de la efectuarea colonizării fungice a lăstarilor înrădăcinați (realizată în momentul plantării exvitroplantulelor în ghivece, în sol, în prezența

unor „inocule starter", care conțineau o unică tulpină fingică de *Glomus mossae* – BEG12, sau un amestec fungic construit din *G. intraradices*, *G. mossae* și *G. deserticole* – comercializat de firma Biorize, din Franța), au fost superiori celor înregistrați la lotul de plante martor, nemicorizate.

Din rezultatele prezentate de *Maximilian* și colaboratorii rezultă că, talia plantelor colonizate cu *micorize* a crescut cu 11,2%, față de aceea marcată la lotul control (exvitroplantulele aclimatizate în sol nemicorizat); numărul de frunze – la lotul *micorizat* – a fost sporit cu 30,3%; volumul radicular – la plante provenite din lotul *micorizat* – a fost superior cu 210% celui înregistrat la lotul martor; greutatea totală a rădăcinilor a fost augmentată cu 279%, iar greutatea întregii plante a fost sporită cu 78,75. Totodată, hifele fungice au ajutat la o mai bună structurare a solului, prin legarea particulelor autonome ale acestuia în conglomerate, formându-se astfel o textură mai aerată a acesteia. În plus, fungii *micorizali* au influențat o mai substanțială acumulare în sol a compușilor humici.

Credem că aceste rezultate sunt relevante în ceea ce privește efectele benefice exercitate de către *simbioza micorizală*, asupra exvitroplantulelor, și dovedesc eficiența practică a unor astfel de tratamente.

Un alt colectiv de cercetare (*Mitică* și colab., 2005), de la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară din București, a efectuat studii axate pe simbioză micorizală. La cel de al XIII-lea Simpozion Național de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, din anul 2004, de la Sighișoara (lucrări publicate în anul 2005) colectivul citat anterior și-a prezentat rezultatele studiilor întreprinse de ei pe vitroplantulele de dud (*Morus alba* L.). Ca și în cazul experimentelor efectuate de către *Maximilian* și colaboratorii (2004), în operațiunile de *micorizare* cercetătorii s-au folosit de un preparat comercial „endorize SOL", produs de firma „Biorize", Franța (licență INRA). Administrarea preparatului *micorizal*, genul *Glomus*, a conținut 10 propagule fungice/g, iar pentru inocularea substratului utilizat în aclimatizarea exvitroplantulele de dud, micropropagate *in vitro* pe mediu MS (1962) suplimentat cu 2 mg/l BA și 1 mg/l Kin (vitrocultura fiind inițiată din explante constând din meristeme axilare, prelevate de la lăstari anuali, recoltați de la plante adulte de dud); în cazul subculturii efectuate în scopul înrădăcinării lăstarilor regenerați din inoculii meristematici, amestecul de regulatori de creștere enumerați mai sus au fost înlocuiți cu AIA 1 mg/l. Aclimatizarea exvitroplantulelor, înrădăcinate *in vitro*, a fost făcută în ghivece cu turbă, substrat în care au fost încorporate 0,5 sau 1 mg per ghiveci, din preparatul comercial cu *endomicorize*. Preparatul *micorizal* a fost administrat numai exvitroplantulelor, în momentul transferării lor în mediul septic de cultură. La 6 luni de la montarea experimentului s-au făcut evaluă-

rile finale ale parametrilor biologici luați în studiu, determinări care au constat în examinări citohistochimice, de viabilitate celulară și analizare a amplasamentului în țesuturile radiculare a formațiunilor fungice; totodată, s-a măsurat volumului sistemului radicular, talia tulpinilor, numărul mediu de frunze și s-au făcut analize gravimetrice. Concluzia finală a autorilor a constat în sublinierea eficiențelor pozitive pe care le produc tratamentele de *micorizare*, mai ales la doza de 1 g „endorize"/ghiveci, preparat micorizal administrat în turbă, substrat folosit în aclimatizarea exvitroplantulelor de dud.

Din punct de vedere practic, în înmulțirea vegetativă, *micorizarea* plantelor are importante implicații economice, în ceea ce privește faptul că, prin *simbioza fungică* se poate stimula rata de micropropagare, impulsionându-se rizogeneza și dezvoltarea plantulelor regenerate din fitoinoculi. Ulterior, *micorizarea* potențează performanțele biologice ale plantelor *simbionte*, chiar și în condiții de mediu mai puțin favorabile, asigurând îmbunătățirea transportului și mobilitatea ionilor din sol, în rădăcini, intensificând nutriția la nivelul plantei gazdă, mărind capacitatea de rezistență a organismelor vegetale la stresul biotic și abiotic, sporind procentul de plantule supraviețuitoare, postaclimatizare, și reducând semnificativ necesitatea aplicării de tratamente cu pesticide (ele însele acționând ca *biopesticide*), sau cu alți compuși chimici, de sinteză; totodată, plantele *micorizate* înfloresc și fructifică mai precoce, iar producțiile agricole sunt mai crescute.

1.5. COCULTURI DE DURATĂ, PRODUSE SPONTAN, ÎNTRE FITOINOCULI ȘI UN FUNG SAPROFIT

Vitroculturile, de orice natură sunt expuse riscului de contaminare a lor cu diferite microorganisme, în special de tip *saprofit*, mai ales atunci când mediile de cultură sunt complexe, așa cum este cazul substraturilor utilizate în practicile de biotehnologie vegetală (*Cachiță*, 1987). Dacă, în cazul vitroculturilor vegetale, efectuate în regim submers – cum sunt cele de rădăcini, de lăstari, de celule sau de protoplaști – o infecție cu germeni *saprofiți* este, de regulă, „catastrofală", în ceea ce privește supraviețuirea fitoinoculilor, întrucât la scurt timp de la inoculare are loc o proliferare a microorganismelor infestante, ceea ce duce la degradarea parametrilor ceruți unui mediu optim de creștere, specific cormofitelor, alterându-se grav condițiile indispensabile bunei evoluții a celulelor și țesuturilor vegetale vitrocultivate, în culturile agarizate, afectarea calității și a compoziției chimice a substratului de viață, respectiv invadarea acestuia de către miceliile fungice, sau de către bacterii, este mai lentă. Deci, dacă în cazul mediilor lichide în urma infectării acestora cu germeni se produce o degradare rapidă a com-

poziției chimice a substratului, în mediile solidificate acest fenomen decurge mult mai încet. Cu toate acestea, de regulă – în aproximativ o săptămână de la inoculare – hifele fungice invadează fitoinoculii, mucegaiurile „sufocând" vitroculturile pe care le-au infestat.

În general, la vitroculturile inițiate din explante prelevate de la nivelul unui material vegetal provenit din mediul septic, riscul apariției de infecții accidentale este mare; astfel de incidente, însă, trebuie evitate, în situația în care procedurile de inoculare privesc operarea de repicări, respectiv de subcultivări, repetate chiar timp de mai mulți ani.

Studii aprofundate referitoare la incidența infecțiilor accidentale, produse cu specii *saprofite*, la nivelul vitroculturior vegetale, sunt rare. De aceea, am considerat important să semnalăm unele aspecte observate de noi, intervenite accidental în condițiile operării fie de subculturi, fie a inițierii de vitroculturi de explante de tip apex, provenite din culturi aseptice, efectuate pe mediile agarizate, situații în care alături de fitoinoculi, pe substratul agarizat, s-a remarcat apariția sporadică, spontană (după o perioadă de timp de la executarea inoculărilor), a unui fung – credem noi de tip *saprofit* – al cărui identitate taxonomică, deocamdată, nu a putut fi determinată de către specialiștii micologi, consultați. În acest context faptic, menționăm că vitroculturile au constat din propaguli de *Drosera*, minibutași de *Asparagus*, protocormi de *Cymbidium* și apexuri caulinare de *Beta* (prelevate de la vitroplantule provenite din embrioni zigotici, obținute prin germinarea în regim aseptic a semințelor de sfeclă). Aceste culturi au avut în comun nu numai laboratorul în care au fost efectuate manoperele de rigoare și tipul de mediu de cultură, ci și condițiile de incubare și de creștere a fitoinoculilor (*Cachiță* și colab., 2008).

Considerăm oportună prezentarea acestor aspecte, întrucât, în funcție de natura fitoinoculilor, între fungul saprofit și unii inoculi cormofitici s-au realizat coculturi stabile în timp (fig. 14A, C și D). Astfel, același tip de miceliu fungic s-a comportat diferit, pe parcursul unei îndelungate perioade de cultură (de ordinul a mai multor luni), neinvadând și „nesufocând" inoculii vegetali, ci conviețuind cu aceștia. Este neîndoielnic faptul că, această infecție a intervenit din cauza nerespectării, întrutotul, a normelor corecte de inoculare a explantelor, cerințe care să asigure asepsia culturilor realizate.

Aspectele macroscopice surprinse la nivelul vitroculturilor aflate în parteneriat, fitoinoculul și fungul, au fost diferite atât ca mod de exteriorizare a infecției, cât și ca viteză de manifestare a acesteia. Astfel, gradul de extindere a infecției, și consecințele acesteia asupra partenerilor asociați, a variat în funcție de genul de plantă cu care fungul s-a aflat în cocultură.

BOTANICAL GARDEN LIBRARY

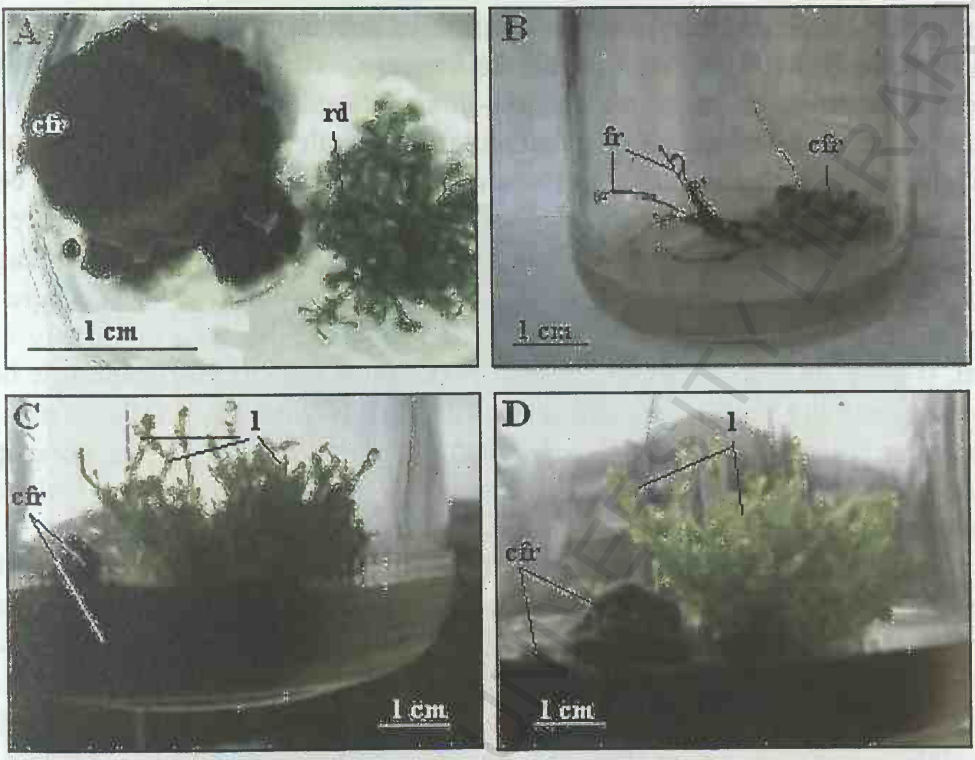


Fig. 14. Coculturi rezultate din asociarea spontană a unor fitoinoculi cu un fung saprofit (**A** – vitrocultură de propaguli de *Drosera rotundifolia* L.; **B** – inocul constând din explant apical, caulinar, de *Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.; **C** şi **D** – vitroculturi de *Asparagus of.* L., aflate în diferite momente de la inoculare; unde: cfr = corp de fructificaţie fungic; rd = rozete de *Drosera*; fr = frunzuliţe plantulă sfeclă; fg = fung; l = lăstăraşi de *Asparagus*) (*Cachiţă* şi colab., 2008d).

Astfel, după cum rezultă din figura 14A-D, evoluţia – în paralel – în absolut aceleaşi condiţii ecofiziologice a inoculilor vegetali şi a fungului, a fost radical diferită, în funcţie de genul căruia i-a aparţinut fitoinoculul. Cu toate acestea, demn de menţionat este că, după inoculare, timp de aproximativ o lună şi jumătate de la asocierea celor doi parteneri, într-un acelaşi recipient şi regim de cocultură, nici unul dintre aceştia nu a fost stânjenit – în prea mare măsură – de prezenţa celuilalt inocul cu care se afla în imediată vecinătate, conviețuind într-un sistem închis, în condiţiile caracteristice regimului ecofiziologic prezent în recipientele de cultură. Doar propagulii de *Drosera* şi cei de *Asparagus*, împreună cu fungul s-au constituit în culturi asociate, de durată, care au evoluat bine, timp de mai multe luni; în cazul coculturii efectuate cu propaguli de *Drosera* (fig. 14A) reacţia fungului a fost diferită, acesta neajungând să-şi dezvolte corpul de fructificaţie complet

conformat, decât după trei luni de la inițierea subculturii. În exemplul citat, proliferarea frunzulițelor, în rozetele de *Drosera*, s-a desfășurat nestânjenită, acestea rămânând verzi, menținându-și vitalitatea și aspectul normal, și având numeroși peri glandulari, tentaculari; în paralel, fungul a dezvoltat un miceliu cu aspect catifelat, de culoare neagră, cu tentă gri. Începând din cea de a 2-a lună de existență a fungului în regim de cocultură cu *Drosera*, treptat hifele lui au început să genereze un corp de fructificație, de culoare neagră, spre gri. După trei luni de cocultură aspectul corpului de fructificație a devenit crateriform (ca un degetar), având pereți înalți de aproximativ 15 mm, și groși de cca. 2 mm, al cărui textură conținea o structură densă de hife, asemănătoare unui plectenchim (fig, 15A-E). În zona bazală, interioară, a craterului, la microscopul optic, la capătul unor hife, s-a distins prezența unor spori. Aceste aspecte, însă, nu ne-au permis să elucidăm cu exactitate, natura taxonomică a fungului.

La vitroculturile de *Asparagus* (sparanghel) (fig. 14C și D), infecțiile fungice – similare cu cele descrise la coculturile de *Drosera* – după cca. cinci luni de asociere a ciupercii cu fitoinoculii de sparanghel, fungul s-a extins ca arie de răspândire, hifele lui ocupând mediul de cultură atât în profunzimea, cât și la suprafață; după aproximativ patru luni de cocultură, la nivelul masei fungice s-a remarcat înălțarea – în zona centrală a miceliului – a unei creste (fig. 14C), care în timp a crescut în volum, dar care nu s-a transformat într-un corp de fructificație de tip crateriform, nici după cinci luni de la inițierea culturii asociate (fig. 14D). Această formațiune, cu aspect de „mușuroi", a atins talia de aproximativ 7-8 mm, având diametru bazal de aproximativ 1 cm. În paralel, din propagulul inițial de *Asparagus* s-a regenerat o masă bogată de calus, la nivelul căruia s-au format și au crescut numeroase tulpinițe (fig. 14C).

În schimb, la vitroculturile asociate, realizate între protocormii de *Cymbidium* și fungul saprofit analizat, s-a constatat o relativ rapidă extindere a hifelor ciupercii, atât în profunzimea, cât și la suprafața masei mediului de cultură. Treptat, fungul – ca și la coculturile efectuate cu *Asparagus* – a înegrit masa agarizată, fără a prezenta excrescențe la suprafața substratului agarizat. Într-o primă fază, protocormii s-au multiplicat, dar după cca. o lună de cocultură aceștia au început să se îngălbenească, și-au încetat proliferarea și creșterea, în final intrând în senescență și în necroză.

La inoculii de *sfeclă de zahăr* (fig. 14B), constând din apexuri caulinare prelevate de la nivelul plantulelor de sfeclă, provenite din embrioni zigotici, prin germinarea semințelor în regim aseptic, miceliul fungic a ocupat o parte din suprafața mediului, dezvoltându-se mai puțin în adâncimea acestuia, formând la nivelul interfeței ciupercii cu atmosfera mai mul-

te excrescențe vălurate, denivelări de culoare gri-negricioasă, care nu a dezvoltat corpi de fructificație nici după o lună și jumătate de la inocularea explantelor de tip apex caulinar, în final fungul invadând întregul mediu, fitoinoculii necrozându-se.

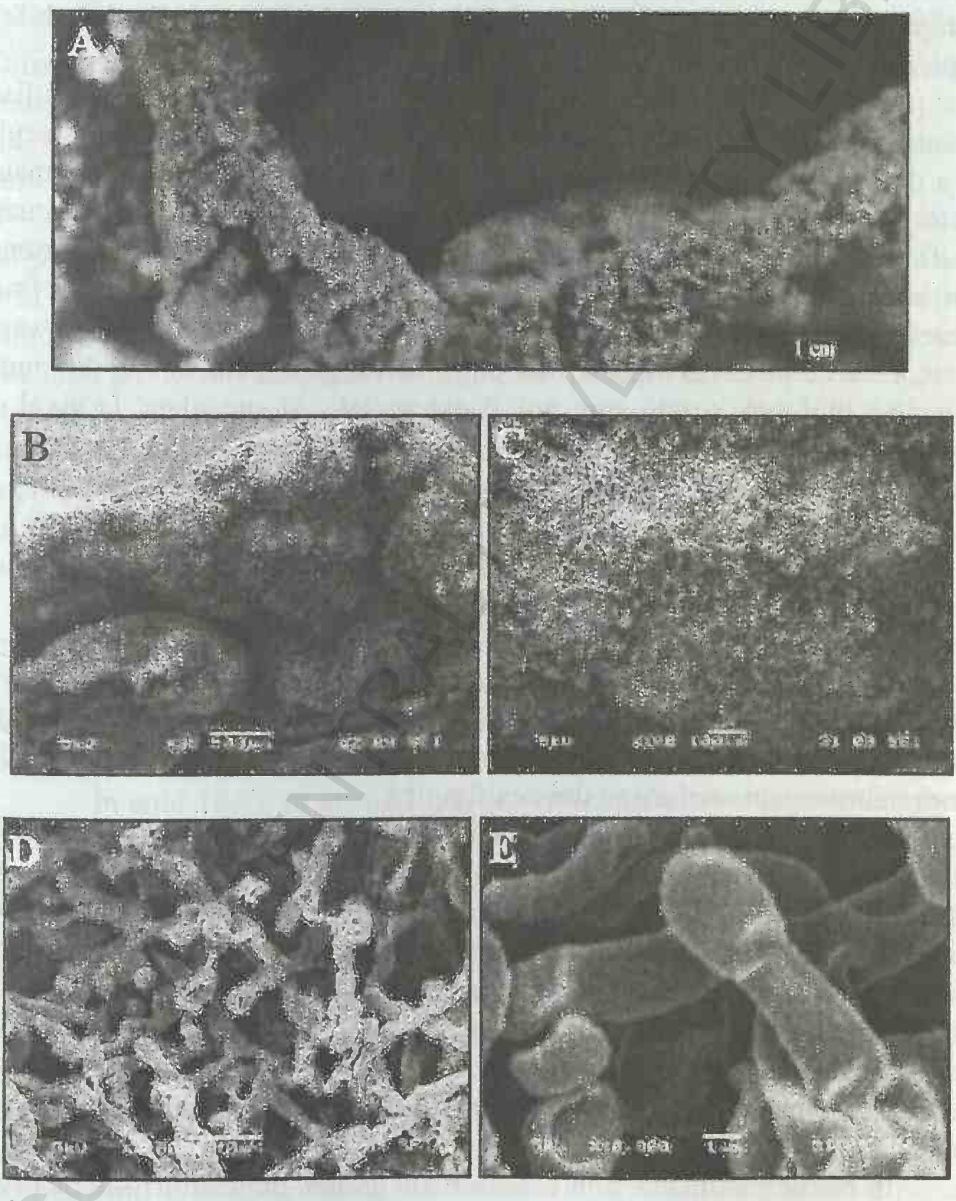


Fig. 15. A – E. Aspecte electronomicroscopice observate la nivelul zonei bazale a corpului de fructificație al ciupercii (unde: A – secțiune transversală prin porțiunea bazală a corpului de fructificație; B-E – aspectul plectenchimului realizat de către hifele fungice) (*Cachiță* și colab., 2008e).

Spre deosebire de vitroculturile de *Drosera* și cele de *Asparagus*, fitoinoculii de sfeclă s-au dovedit a manifesta – ca și culturile de protocormi de *Cymbidium* – o sensibilitate la prezența fungului în imediata lor vecinătate. La sfeclă, hifele ciupercii s-au dezvoltat chiar în zona bazală a explantului caulinar, de tip apical, înconjurându-l. În timp, din acesta au luat naștere mai multe frunzulițe lung pețiolate, care, însă, atinse fiind de hifele ciupercii treptat s-au necrozat (fig. 14B).

Cercetările noastre au dovedit o posibilă tolerare, de către unii fitoinoculi, a unor fungi saprofiți, într-un cadru artificial creat. Reacția inoculilor a depins – într-o foarte mare măsură – de genul și specia organismelor aflate în regim de cocultură, variatele aspecte surprinse în astfel de situații pot fi analizate prin prisma raporturilor ce se stabilesc între un partener aparținător unui organism inferioar din punct de vedere filogenetic și fragmentele de organe sau chiar de țesuturi calusale, aflate în imediata lor vecinătate, ceea ce ne oferă aspecte mai puțin investigate, până acum, din punct de vedere biologic, reacții care pot fi extrapolate, și speculate, la nivel de funcționalitate a rădăcinilor, ori a organismului vegetal în totalitatea lui, în condițiile complexelor situații existente, în mod natural, în *rizosferă*.

1.6. GREFELE SAU FITOINOCULI ASOCIAȚI

1.6.1. CONSIDERAȚII GENERALE

După cum s-a văzut în subcapitolele precedente, în biotehnologia vegetală practicile de *cocultură* subînțeleg realizarea unor *asocieri* – de mai scurtă sau, mai ales, de mai lungă durată – între fitoinoculi și parteneri din lumea microorganismelor sau din cea fungică.

Dar, după părerea noastră, tot în categoria coculturilor – respectiv a culturilor asociate – pot fi încadrate și *grefele*, care în biologia vegetală mai poartă numele de *altoiri*. În astfel de asocieri, dacă partenerii sunt compatibili, țesuturile lor concresc și interrelaționează. Asemenea practici, în morfofiziologia plantelor, sunt considerate ca făcând parte din tehnicile de înmulțire vegetativă a acestora, iar procedura poartă numele de *hibridare vegetativă*. Fragmentul *grefat*, sau *altoit* pe o plantă, va fi nutrit de către *portaltoi*, cu care implantul (altoiul), în timp, va forma un organism (corp) comun.

În medicina umană și în cea animală grefele de țesuturi sau de organe sunt practicate cu succes, grație performanțelor atinse în zilele noastre de tehnicile moderne de chirurgie. În domeniul medical, transplanturile de țesuturi sau de organe (respectiv grefoni) se fac fie cu material biologic proaspăt

recoltat, fie folosind grefe tisulare ori fragmente de oase, de piele, de vase, sau chiar de organe, crioconservate.

Atât în medicină, cât şi în procedurile de grefare practicate în lumea vegetală, reuşita implantului, şi supravieţuirea partenerilor sudaţi într-un unic organism funcţional, va depinde nu numai de măiestria operatorului, ci şi de o multitudine de alţi factori, dintre care cei *endogeni* – genetici şi morfofiziologici – joacă un rol major. Atunci când grefonii provin din acelaşi individ se realizează *autografe* sau *homografe*; dacă transplantul se operează cu material biologic donat de un alt organism se obţin *heterografe*, rezultând un *heteroimplant* (*Champagnat*, 1980).

După operarea implantului, ţesutul sau organul transplantat urmează să se integreze cât mai repede în organismul primitor, să realizeze cu acesta – la locul de contact a celulelor celor doi asociaţi – un parteneriat funcţional, fiind obligatorie stabilirea unei comunicări tisulare, care să demareze iniţierea unei proliferări celulare, restituţionale, procese care să permită suturarea ţesuturilor devenite asociate, *grefonul* (altoiul) resorbindu-se într-un sistem stabil, în care a fost implantat, realizând un corp comun, ce se menţin ca atare, atât timp cât organismul primitor trăieşte. În urma acestor procese, între cei doi parteneri se va instala un mecanism de „coabitare". La plante, o astfel de asociere este menită să înnobileze calităţile portaltoiului vegetal.

În China antică, la plante *grefele* erau practicate cu mai mult de un mileniu înaintea erei noastre (*Hartmann* şi *Kester* 1983).

Marele *Darwin* (1868), în cartea sa intitulată „*Variabilitatea animalelor şi plantelor în stare de domesticire*", s-a referit şi la hibrizii vegetali, obţinuţi prin *altoire*.

În anul 1880, în insula Java, se realizau plantaţii masive de arbori de chinină (*Cinchona ledgeriana*), prin folosirea de puieţi altoiţi, înnobilaţi prin grefarea cu mlădiţe provenite de la plante selectate, ce aveau capacitate foarte crescută de a sintetiza chinină, compus indispensabil în tratarea malariei (*Schreiner*, 1962).

Gautheret, în magnifica sa monografie publicată în anul 1959, dedicată vitroculturilor de ţesuturi şi celule vegetale, a scos în evidenţă faptul că, procedurile de *grefare* – operabile în vitroculturile vegetale – presupun efectuarea de practici mai complexe, rezultatele obţinute servind nu numai la analizarea căilor de interrelaţionare a partenerilor, ci şi ca *modele* experimentale într-o serie de studii, privind asociaţia realizată, procesele regenerative şi cele histo- şi de morfogeneză, instalate la nivelul de concreştere. *Gautheret* a menţionat că, şi în cadrul natural, la plante se observă producerea spontană de autografe, fapt încă inexplicabil. În figurile 16 prezentăm diferite autografe naturale, realizate între trunchiuri sau ramuri de copaci

(fig. 16), între rădăcini (fig. 17A), tuberculi de cartofi (fig. 17B), corpuri de fructificație la ciuperci (fig. 17C), componentele florale, respectiv între ovarele ce se transformă în fructe (fig. 18A-C şi 19A şi B), sau între receptacule (fig. 18D).

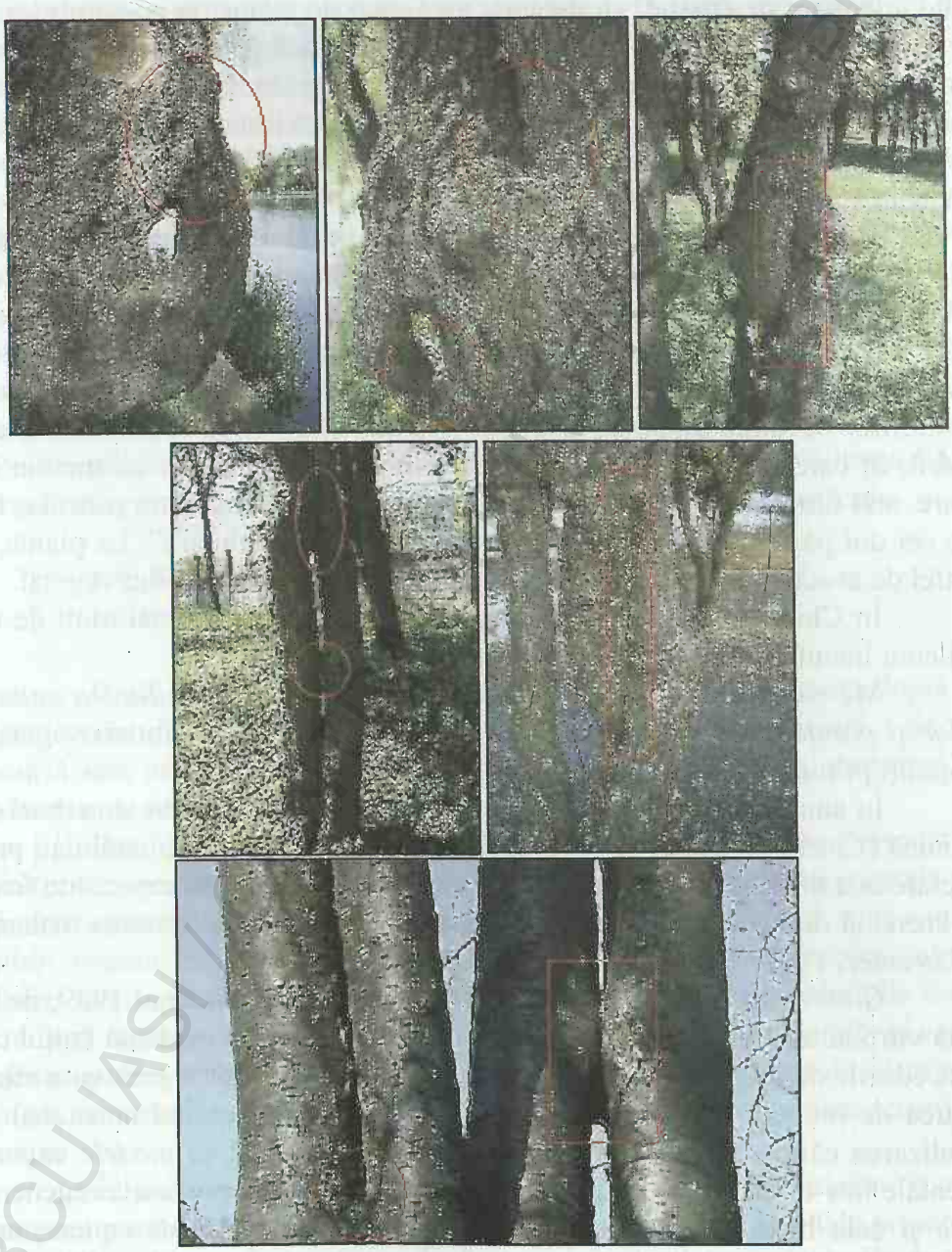


Fig. 16. Autogrefe naturale la nivelul trunchiurilor sau a ramurilor unor arbori.

BCU IAŞI / LIBRARY

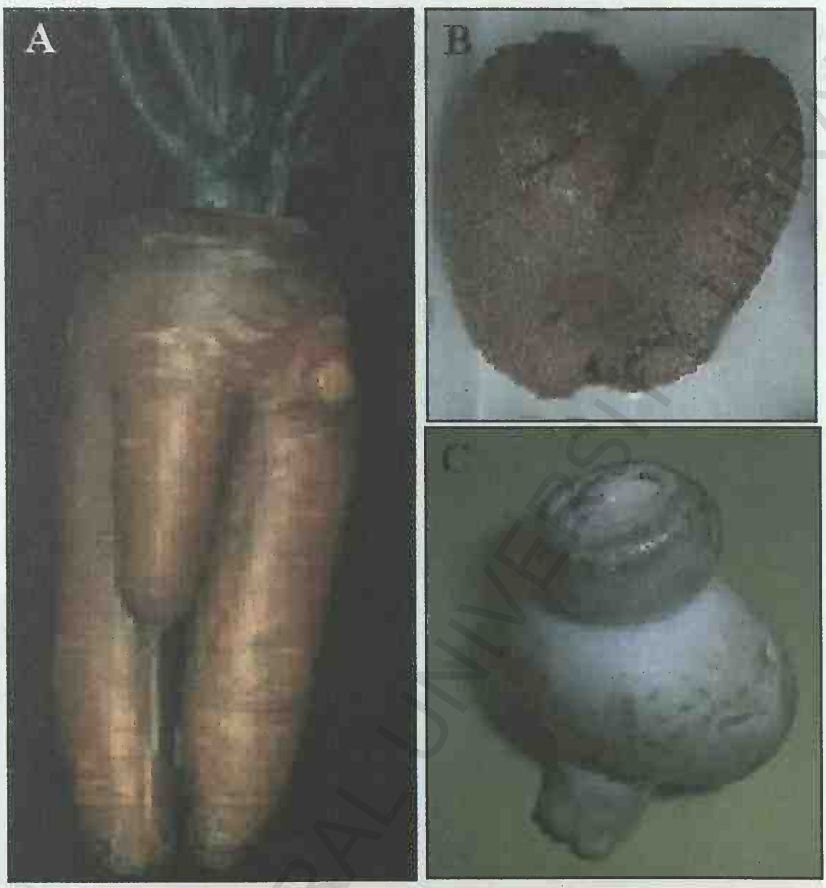


Fig. 17. Autogrefe naturale: A – la rădăcini de morcov; B – tuberculi de cartofi; C – corpuri de fructificație de ciuperci.

Surprinzător este faptul că, fenomenul de autogrefă nu este rarisim, el poate fi întâlnit atât la organele vegetative, cât şi la cele generative. Acest fenomen de concreştere, în general, într-o foarte mică măsură a făcut obiectul unor dezbateri în literatura de specialitate. Uneori, acest fenomen a fost catalogat ca şi cazuri teratologice.

În horticultură şi în silvicultură, *altoirile* servesc la *clonarea* varietăților create prin tehnici de ameliorare, în care operațiunile de selecție presupun o muncă laborioasă, de ani de zile. De foarte multe ori, exemplarele obținute prin tehnicile de încrucişare sexuată şi prin selecție nu au flori fertile, neproducând seminţe ele nu pot fi înmulțite pe cale zigotică. De altfel, în cazul speciilor cu valoare comercială, sau cele de interes silvic, propagarea se face numai pe calea înmulțirii vegetative, pentru a fi asigurată clonarea şi menținerea în cultură a varietăților care sunt solicitate de către horticultori şi

de silvicultori. După *Bonvarel* (1955) prin intermediul practicilor de altoire, în silvicultură s-au realizat așa numitele plantații de clone.

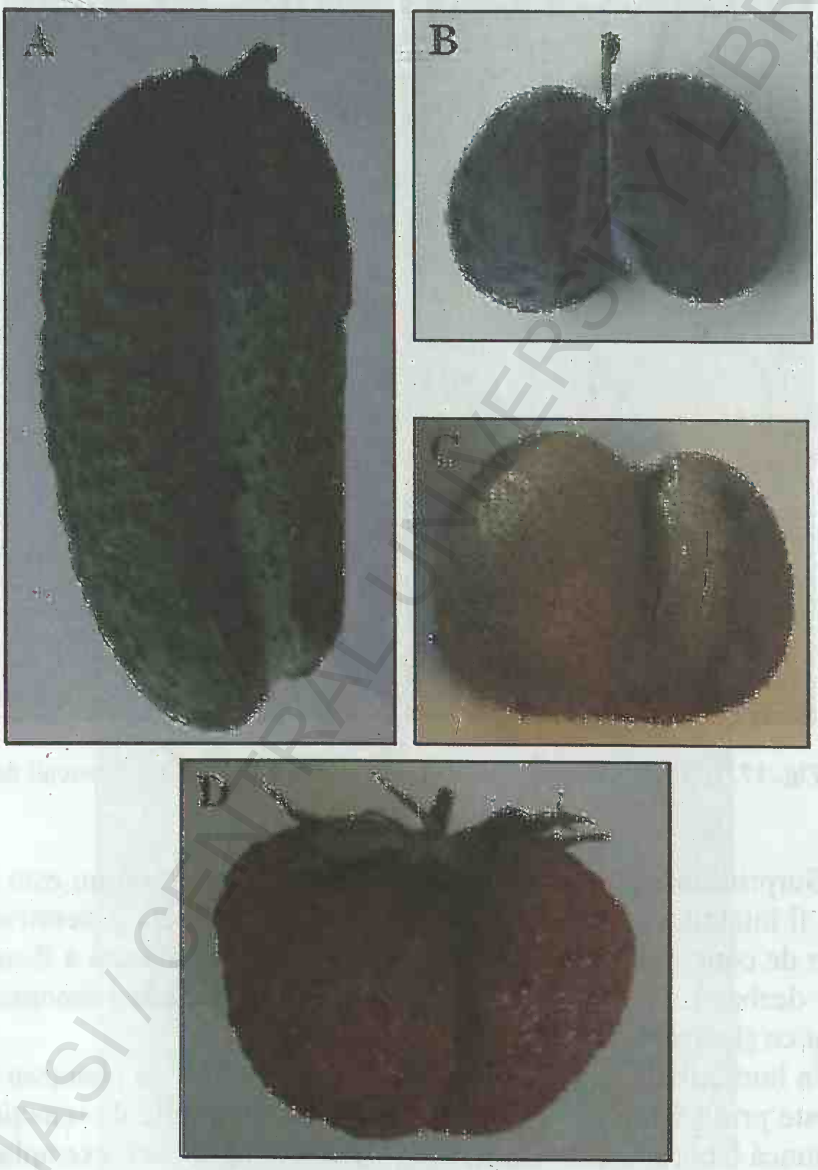


Fig. 18. Fructe provenite din concreșterea (autogrefarea) ovarelor: A – la castraveți; B – la prune; C – la kiwi; D – receptaculelor provenite de la două flori de căpșun.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

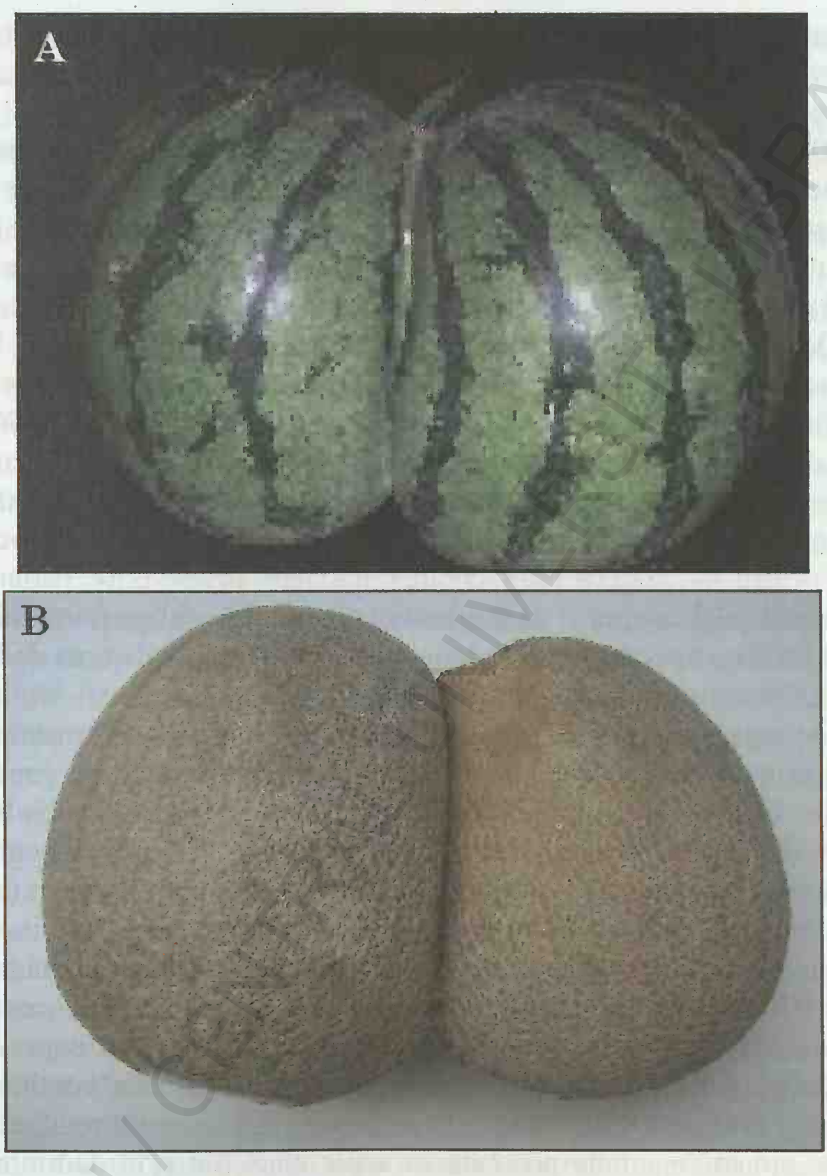


Fig. 19. Autografă între două fructe de pepene verde (A) şi de pepene galben (B).

Până la clonarea şi micropropagarea eficientă a plantelor de interes economic, procedurile de altoire *in vitro* au fost cele care au asigurat o largă răspândire în plantații a genotipurilor selectate în cadrul practicilor de ameliorare a speciilor lemnoase: pomicole, horticole, viticole şi silvice. În schimb, în cazul speciilor erbacee – dicotiledonate şi monocotiledonate – procedurile de altoire au fost mai puțin practicate, întrucât, în general, altoirile au servit la clonarea varietăților care nu pot fi înmulțite pe o altă ca-

le vegetativă, cum este butășirea, marcotajul sau prin intermediul organelor de rezervă (rădăcini și tulpini tuberizate, bulbi, bulbili, bulbotuberi, rizomi, stoloni, protocormi etc.).

După *Enescu* (1982), se cunosc peste 200 de tehnici de altoire. Dintre plantele lemnoase, gimnospermele ridică probleme mai speciale în ceea ce privește altoirea, din cauza rășinii conținute în canalele rezinifere prezente în țesuturile acestor specii vegetale. Dar, rășina nu împiedică fuzionarea altoiului cu portaltoiul, ci chiar ajută la consolidarea aderenței celor doi parteneri. De altfel, în cadrul practicării procedurilor clasice de altoire, la locul de contact a partenerilor, de regulă se recomandă aplicarea unor preparate menite fie să stimuleze procesele regenerative, fie să izoleze și să protejeze zonele „operate", preîntâmpinându-se astfel producerea de infecții cu agenți saprofiți sau fitopatogeni, odată cu infiltrarea în interstițiile țesuturilor de fuziune a apei pluviale. În funcție de tipul de altoire practicat, în procedurile clasice, pentru asigurarea unui contact cât mai strâns între parteneri, în punctele critice (deasupra și dedesubtul explantului grefat pe portaltoi), zona în care a fost încorporat altoiul trebuie consolidată, prin aplicarea de legături fixatoare, frecvent executate cu rafie.

De regulă, în *altoire* – în selectarea explantului care urmează să fie grefat – primează caracterele estetice sau cele productive ale genotipului clonat, iar în alegerea portaltoiului se are în vedere valoarea biologică a plantelor destinate să fie purtătoare de altoi. De exemplu, nucul negru (*Juglans nigra*), servește ca portaltoi pentru nucul nobil, european (*Juglans regia*), întrucât acesta este mai rezistent la boli; în schimb, la vița-de-vie, soiurile nobile sunt altoite pe portaltoi de viță americană, rezistentă la atacul filoxerei (*Ciobanu*, 1971). Dacă în urma grefării „parteneriatul" reușește și țesuturile concresc (realizându-se joncțiunile vitale necesare supraviețuirii *grefonului*), cei doi asociați – *altoiul* și *portaltoiul* – își vor continua viața împreună, țesuturile lor îngemănându-se și suturându-se prin regenerarea de celule fie din meristemele prezente în acele zone, fie prin dediferențierea celulelor adulte, grație fitohormonilor migrați sau generați în zona în care structurile vii au fost traumatizate prin tăiere. Dacă partenerii sunt prea îndepărtați din punct de vedere filogenetic, aparținând la specii sau chiar la genuri diferite, vorbim despre *heterografe*. În astfel de cazuri, șansele de reușită ale parteneriatului, și cele de supraviețuire, adeseori sunt nule. La combinații între parteneri proveniți de la familii diferite, „prinderea" altoilor este puțin probabilă. Totuși, în cadrul unor familii, de exemplu la *Solanaceae*, *Papilionaceae* și la *Cucurbitaceae*, altoirile interspecifice și intergenice sunt, adeseori, posibile.

De regulă, fragmentul care se constituie în altoi este mult mai tânăr decât portaltoiul şi mult mai redus ca dimensiune decât acesta.

Cel mai adesea, explantele utilizate ca altoi constau din muguri, ori din fragmente de tulpini tinere, cu muguri, ori ele pot fi apexuri de plantule, mai rar rădăcini.

După ce fuziunea celor doi parteneri asociaţi prin grefare a avut loc, portaltoiul împreună cu altoiul se transformă într-un organism *hibrid*, la care caracterele manifeste nu se moştenesc genetic şi nu se pot transmite prin seminţe, la descendenţi. Plantele rezultate sunt numite fie *hibrizi de grefă* (*Champagnat*, 1980; *Hartmann* şi *Kester*, 1983), fie *hibrizi vegetativi* (*Ciobanu*, 1971), *hibrizii* respectivi semnificând o fuziune morfologică a doi sau a mai mulţi parteneri, ce împreună alcătuiesc un corp comun, funcţional.

Termenul de *hibrid*, în domeniul genetic, are o altă încărcătură semantică. În unele cazuri, *hibridul* rezultat în urma altoirii poate prezenta un amestec de caractere ereditare ale partenerilor implicaţi în hibridare. Încă în anul 1829, în urma altoirii unui salcâm galben (*Cytisus laburnum*) pe un portaltoi cu flori roşii (*Cytisus purpureus*), *Adam* a obţinut un hibrid vegetativ – hibrid de grefă – care producea flori roz; unele exemplare ale hibridului realizat (denumit de autor *Cytisus adami*) au prezentat toate cele trei tipuri de culori, de flori. *Winkler* (1938), ulterior, a demonstrat caracterul de himere al acestor plante (*Ciobanu*, 1971).

Într-o fază iniţială, celulele şi ţesuturile *altoiului* sunt alimentate exclusiv cu apă, săruri minerale, sevă elaborată şi cu fitohormoni, prin intermediul vaselor libero-lemnoase ale *portaltoiului*. După ce *altoiul* creşte, joncţiunea cu portaltoiul se menţine, dar după ce *altoiul* dă naştere la o tulpină cu ramuri, muguri, frunze, flori şi, în final, cu fructe (ce prezintă caracterele de „noblеţe" ale plantei donatoare de grefoni) frunzele lui vor alimenta cu sevă elaborată, derivată din procesul de fotosinteză al acestuia, atât altoiul cât şi *portaltoiul*, ţesutul grefat şi organele regenerate la nivelul lui rămânând tributare portaltoiului doar pentru seva brută, ce-i este pompată în ţesuturi de către sistemul radicular al partenerului cu care a fost asociat. După stabilirea unor interrelaţii perfecte între *portaltoi* şi *altoi*, de cele mai multe ori organele aeriene ale *portaltoiului* trebuie înlăturate, portaltoiul continuând să asigure celor doi parteneri asociaţi, fixarea în sol a plantei purtătoare, denumită şi *hipobiot*; în acest context, altoiul este supranumit *epibiot*. În mod normal, ca portaltoi sunt alese plante neameliorate, uneori ce provin din flora spontană.

Sunt situaţii în care, unui unic portaltoi îi sunt grefaţi mai mulţi altoi, fie într-o zonă comună, fie pe ramuri diferite. De exemplu, pe o unică tufă

de liliac se pot grefa altoi ce provin de la soiuri care produc inflorescențe cu flori simple sau involte, de mărimi și culori variate.

Practicile tradiționale de altoire reprezintă *macrografe*. Dar, în epoca biotehnologiei vegetale, moderne, procedurile de grefare se practică și *in vitro*. În acest caz vorbim despre *microgrefe*. Ambele modalități de grefare, respectiv de altoire, operate în condiții naturale sau *in vitro*, prezintă numeroase elemente comune, care țin atât de cerințe de ordin biologic ale altoiului și portaltoiului, cât și de aspecte referitoare la condițiile în care astfel de tehnici pot fi efectuate cu succes, în aceste fuziuni fiind implicați factorii endogeni și exogeni, în principal un rol important jucându-l zestrea genetică a partenerilor cocultivați și condițiile ecofiziologice în care conviețuiesc *in vitro* cei doi asociați.

Vitrografările presupun efectuarea operațiunilor de transplant în condiții aseptice, uneori manopera de grefare presupunând folosirea unor tehnici de microchirurgie. De la caz la caz, după efectuarea vitrografării, regimul de asepsie trebuie menținut o anumită perioadă de timp. Dacă grefele au fost făcute pe plantule, acestea, treptat, vor fi aclimatizate *ex vitro*.

Altoirea plantelor constituie și o modalitate de a asigura – prin calitățile portaltoiului – o rezistență sporită a plantelor rezultate, în raport cu un potențial atac produs de diferite insecte sau de variați agenți fitopatogeni. După cum s-a mai amintit în prezenta monografie (p. 44), anumite tipuri de altoiri, efectuate *in vitro* (fig.24) asigură obținerea de plante libere de viroze, la specii la care culturile de explante meristematice nu dau rezultatele scontate, mai ales la esențele lemnoase a căror meristeme primare, caulinare, pot suferi un proces de „îmbătrânire fiziologică", capacitatea lor regenerativă scăzând, pe măsură ce mugurele donator se află situat mai departe de polul radicular (*Cachiță*, 1987).

1.6.2. PRINCIPIILE DE BAZĂ CARE TREBUIE RESPECTATE ÎN PRACTICILE DE ALTOIRE (GREFARE)

In analizarea reacției organismelor vii, sau a unor părți din acestea, ca și în oricare alt proces biologic, trebuie luate în considerare atât efectele factorilor *endogeni,* cât și a celor *exogeni,* prezenți la momentul respectiv, estimându-se gradul lor de influență și de interferență, în contextul dat, facilitând supoziționarea posibilelor consecințe provocate într-un anumit demers uman. În consecință, în practicile de *altoire* există anumite *principii de bază* care pentru asigurarea reușitei „prinderii" *altoiului* de *portaltoi* trebuie respectate, uneori, chiar cu multă strictețe, măsuri care într-o mare parte, sunt valabile atât în cazul în care se operează cu macro- cât și cu microgrefe (*in*

BCU Cluj / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

vitro); din categoria factorilor *endogeni*, în primul rând trebuie avută în vedere apartenența *genetică* a celor doi parteneri implicați în grefare, în caz contrar operațiunea de implant se soldează cu respingerea altoiului și cu necrozarea acestuia. Astfel, în cazul semnalării incompatibilității dintre *altoi* și *portaltoi* s-a pus în evidență faptul că, uneori, chiar și diferențele de ordin *genotipic*,existente între cei doi parteneri asociați, pot conduce – mai devreme sau mai târziu – la imposibilitatea stabilirii unor interrelații viabile între aceștia, conducând la moartea *altoiului*. În cazul altoirilor practicate între speciile de stejar, fag, paltin, și alte esențe lemnoase, procentul de reușită poate fi, în general, foarte scăzut. Altoirile intergenerice, atunci când partenerii supraviețuiesc, conduc – de foarte multe ori – la obținerea de rezultate slabe, în ceea ce privește reușita grefării.

Compatibilitatea sau *incompatibilitatea* de concreștere a partenerilor, în situația în care țesuturile lor sunt puse în contact (chiar și în condiții naturale, fără rănire), joacă un rol esențial în realizarea fuziunii tisulare. Această reacție se exprimă mai puternic, și mai repede, atunci când între partenerii asociați se realizează un *contact* intim, de o mai mare întindere, între zonele meristematice ale acestora (cel mai frecvent fiind vorba de cambiu), cu condiția ca celulele din porțiunile traumatizate să se mențină vii. În asemenea condiții, factorii traumatici – cum sunt fitohormonii și exudatele celulare – joacă, adeseori, un rol major.

Incompatibilitatea partenerilor poate fi datorată nu numai inadvertenței genetice, ci ea poate fi o consecință a unei imposibilități de interacționare a unor procese metabolice, sau a prezenței în țesuturile unora dintre parteneri (sau a ambilor) a unor maladii, ori a existenței între aceștia a unor prea mari diferențe de vârstă sau de structură morfoanatomică etc.

Evident că, între *altoi* (grefă sau *grefon*) și *portaltoi*, în zonele rănite, imediat se stabilesc relații reciproce, ce pot să se extindă în timp, devenind benefice pentru ambii parteneri sau, dimpotrivă, interrelațiile temporar instalate pot să fie stopate, fenomen care poate să se extindă și chiar să se ajungă la respingerea *grefei*, altoirea eșuând. În unele cazuri, se pare că și la plante există o incompatibilitate fundamentală între parteneri, asemănătoare celei de la grefele animale, dar dovedirea ei – din punct de vedere biochimic – încă nu a fost confirmată.

Între celulele *altoiului* și cele ale *portaltoiului*, natura relațiilor care se stabilesc este variată, el depinzând de tipul și vârsta partenerilor, anatomia și histologia organelor sau a fragmentelor implicate, modul de altoire practicat, raporturile de mărime dintre aceștia, epoca sau sezonul de vegetație în care se operează altoirea, condițiile de mediu etc. Pe lângă factorul genetic, care joacă un rol esențial, nivelul și natura rezervelor endogene – nu-

triționale și fitohormonale – conținute în biostructurile partenerilor sunt, de asemenea, hotărâtoare în realizarea proceselor regenerative și în comunicarea intercelulară, fitohormonii având un rol de prim ordin în dinamizarea sau stoparea fenomenelor proliferative. Lipsa unei interacții pozitive între *portaltoi* și *altoi*, care să concorde cu cerințele fiecăruia dintre parteneri, în ceea ce privește natura raporturilor de comunicare dintre aceștia și a schimburilor nutriționale de tip „punte", face ca – mai devreme sau mai târziu – *altoiul*, care este partea cea mai vulnerabilă a asociației ce se dorește să devină funcțională, să se necrozeze.

În parteneriatul asociativ, care se speră să fie realizat între *grefon* și planta acceptoare a acestuia, *portaltoiul* este acela care, de regulă, se constituie în componenta predominantă, el deținând dimensiunea cea mai mare, având rolul să asigure aprovizionarea cu apă și cu nutrienți a ambilor parteneri; în plus, el are menirea nu numai să „accepte" *altoiul* și să-l nutrească, ci și să-l susțină fizic, pe tot parcursul existenței celor doi parteneri. Celulele și țesuturile *portaltoiului* trebuie să integreze *altoiul* într-un sistem de interrelaționare unitar, cei doi parteneri racordându-și citoplasma celulelor la rețeaua de plasmodesme, prin care se realizează și circulația fitohormonilor și funcționarea receptorilor meniți să decodifice mesajele transmise de acești compuși.

În *altoire,* ca și în butășire, trebuie să se respecte, cu strictețe, *orientarea polară*, corectă, a *altoiului* (*grefonului*), care trebuie să corespundă celei naturale, respectiv explantul grefat să fie situat – în zona delimitată pe portaltoi – cu polul radicular sau bazal în porțiunea de jos a locului de amplasare a grefonului, pe portgrefă, și cu polul caulinar, apical, în sus. În caz contrar, procesele regenerative nu vor reuși, și nu se va realiza sudarea țesuturilor și joncțiunea funcțională a celor doi parteneri.

Niciunul dintre parteneri asociați, *portaltoiul* – ce are *grefate* în structurile sale unul sau mai mulți *altoi* – și *grefonii* implantați în țesuturile lui, în contactele care se stabilesc între ei, nu au o reacție pasivă. Cota de participare a explantelor *grefate* pe un organism vegetal, cu rol de *portaltoi*, în realizarea unui viitor sistem unitar, supraviețuitor, nu poate fi încă evaluată, astfel ca prin această estimare să se poată prognoza șansa de supraviețuire în timp a parteneriatului odată realizat, întrucât se cunosc și reacții de respingere, intervenite chiar și după zeci de ani de conviețuire a *portaltoiului* cu *altoiul*, caz citat de *Enescu* și colaboratorii (1994) la *Duglas*, la care respingerea unui *altoi* poate să se producă de timpuriu, chiar în anul respectiv, sau chiar și după două decenii de la efectuarea grefării. În plus, locul de sutură al *altoiului*, pe *portaltoi*, rămâne un punct vulnerabil la fractură, pe tot parcursul existentei parteneriatului respectiv, mai ales în cazul ex-

punerii acestor plante la vânturi puternice. În general, deschiderea mugurilor vegetativi, prezenți la nivelul *altoiului* (sau în cazul altoirii în ochi, mugurele care constituie grefonul), poate fi apreciată ca o reacție de compatibilitate dintre partenerii de altoire (*Copes*, 1970).

Procesele regenerative sunt demarate de reacțiile posttraumatice concretizate prin prezența fitohormonilor la locul de contact a partenerilor implicați în procedura de *grefare*, care fie determină dediferențierea celulelor definitivate morfofiziologic în țesuturi diferențiate și transformarea lor în meristeme, fie intrarea în diviziune a meristemelor existente în zona lezată, cu declanșarea unei intense activități mitotice, care să se instaleze la locul de rănire, generând țesut calusal, un parenchim fundamental menit să cicatrizeze zona traumatizată, și să realizeze suturarea țesuturilor comune, respectiv racordul dintre *altoi* și *portaltoi*. În consecință, în cazul *grefelor vegetale* unul dintre principiile de bază care trebuie avute în vedere în grefologie, constă în stabilirea unei cât mai extinse zone de contact a țesuturilor secționate, astfel încât prin alipirea lor, în primul rând cambiul celor doi parteneri (dacă el există în cele două fragmente asociate), să fie alipit strâns și zona de altoire să fie imobilizată prin legare.

La monocotiledonate, neexistând cambiul, altoirea trebuie făcută la nivelul meristemului intercalar, situat la baza fiecărui internod. În unele cazuri, și cambiul intrafascicular, sau celulele care se diferențiază și redevin meristeme, pot să aducă o contribuție esențială la înfăptuirea fuziunii dintre *altoi* și *portaltoi*; tinerețea țesuturilor asociate, viabilitatea celulelor partenerilor supuși grefării și calitatea acestora, respectiv abundența celulelor vii, nelignificate și nesuberificate, la locul de contact între parteneri, sunt factori endogeni care favorizează cât mai de timpuriu stabilirea legăturii între părțile puse în contact. În situația în care la locul grefării se manifestă fenomene de *incompatibilitate*, de cele mai multe ori în zona de contact, la interfața pereților celulelor implicate direct în zona de altoire, se produce o suberificare a acestora, fenomen care provoacă o suprimare a proceselor de comunicare și de schimburi intercelulare, în zona respectivă instalându-se necroze celulare și moartea *altoiului*, respectiv a grefonului. Respingerea *altoiului* de către *portaltoi* se manifestă printr-o pierdere a turgescenței mugurașilor sau a frunzulițelor de pe *altoi*, apoi, îngălbenirea tinerelor frunzulițe de pe acesta, apariția de zone de separație la nivelul suturii, sau, uneori, formarea la locul de concreștere a unor țesuturi hipertrofiate, anormale etc. În general, la locul de sutură a partenerilor, nu trebuie să apară excrescențe prea mari, nedorindu-se interpunerea unor mase parenchimatice pe traiectul țesutului conducător, care – eventual – ar putea bara racordarea vaselor lemnoase (xilem) și a celor liberiene (floem), a celor doi parteneri. Pentru ca *altoirea*

să fie realizată cu succes, ambii parteneri trebuie să fie sănătoși, și mai ales să nu fie contaminați cu virusuri; în caz contrar, grefarea va eșua.

În reușita *altoirii* și factorii *externi* joacă un rol deosebit de important. Dintre aceștia menționăm: temperatura, umiditatea (atmosferică și cea a solului), variațiile sezoniere ale acestora, oxigenarea țesuturilor rănite, administrarea exogenă de regulatori de creștere etc.; fiecare factor, luat separat, precum și ansamblul ecologic realizat, exercită o contribuție importantă în realizarea proceselor regenerative și în amploarea acestora. Natura și intensitatea acestor factori externi poate favoriza, temporiza sau împiedica procesele de multiplicare celulară, formarea calusului de sutură și racordarea vaselor din fasciculele libero-lemnoase ale celor doi parteneri, îndeplinind condițiile facilitării prinderii *altoiului* de *portaltoi*, într-un tot unitar. Nu trebuie scăpat din vedere nici faptul că, în perioada sezonului rece (toamna târziu și iarna), în zonele temperate, *cambiul* își încetează activitatea, moment care corespunde și cu intrarea mugurilor în latență.

De fapt, *altoirile* nu sunt binevenite nici în perioada de anteză, sau în faza de fructificare. În consecință, pentru reușita *altoirii* trebuie să se aleagă cel mai favorabil sezon, dar și stadiu fiziologic optim, atât pentru recoltarea *altoiului* și dimensionarea acestuia, cât și pentru fasonarea *portaltoiului* și grefarea implantului după cea mai potrivită procedură. Important este și ca între momentul recoltării *altoiului* și operarea implantării acestuia pe *portaltoi*, să nu treacă prea mult timp, întrucât trebuie evitată desicarea atât a suprafețelor care urmează să fie puse în contact, cât și a celulelor situate mai în profunzimea acestora.

Dacă partenerii de *grefa* sunt compatibili și momentul *altoirii* este optim, în aproximativ 2-3 săptămâni de la operarea asocierii țesuturilor (astfel încât zonele lor meristematice să fie puse în contact), la nivelul comuniunii se generează un țesut calusal, care treptat realizează o conexiune, mai ales atunci când în sistemul realizat se află și un țesut cambial.

În cazul *microaltoirilor*, practicate *in vitro*, condițiile ecofiziologice sunt reglate cu mare precizie și sunt reproductibile. Pe de altă parte, în vitrografare atât *portaltoiul*, cât și *altoiul*, sunt constituiți din țesuturii foarte tinere, slab diferențiate. În plus, în mediile de cultură sunt prezenți variați regulatori de creștere, pe lângă aceasta, în substrat, în imediata vecinătate a *portaltoiului* pot fi administrați o gamă largă de stimulatori de creștere, cu care pot fi dirijate – într-o mare măsură – procesele regenerative și de morfogeneză.

La tehnicile de vitrocultură, termenul de *grefare,* respectiv cel de *grefaj*, este mai frecvent utilizat decât cel de altoire. Adeseori, *grefele* constau din explante tisulare, sau de mici dimensiuni (uneori fiind fragmente

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prelevate de la plantule rezultate din germinare aseptică a semințelor) (fig. 24).

Ca și la *altoirea* prin metode tradiționale (fig. 20 și 21) și în cazul *microaltoirii,* respectiv în tehnicile de *microgrefare* (fig. 22), există variate proceduri care se practică, în funcție de scopul urmărit, natura partenerilor, mărimea acestora etc.

În altoiri, cu cât suprafața *grefonului* este mai mare, cu atât sporește riscul expunerii acestuia la infecții secundare.

Există câteva tipuri principale de *grefe* care se practică în laboratoarele de vitroculturi vegetale; astfel, *grefele* pot fi constituite din rămurelele sau lăstarii, ori din mugurii, apexuri sau fragmente de țesuturi, modalitățile de amplasare ale unei *grefe* în *portgrefă*, ca fragment partener, fiind foarte variate (fig. 22-24).

Parteneri asociați în cocultură pot consta din două fragmente tisulare identice, formate – la zona de atingere a lor – din cambiu secondat de parenchim, unul dintre fragmente fiind amplasat cu porțiunea de parenchim situată în contact direct cu mediul de cultură aseptic, iar cel de al doilea cu zona tisulară expusă în atmosfera din recipientul de cultură (fig. 22). Un alt posibil amplasament al țesuturilor partenere, în operațiunea de vitrografare, este ca ambele fragmente supuse *grefării* să fie amplasate pe mediul de cultură la profunzimi diferite, fie ca fragmentele să se mențină legate, respectiv imobilizate (strânse) cu ajutorul unui fir steril de lână, ori în imediata lor vecinătate să se afle amplasate bucățele de mediu agarizat sau de hârtie de filtru, ce să conțină anumiți regulatori de creștere.

O tehnică de *grefare,* mai apropiată ca procedură de practicile de *altoire,* este aceea de introducere a țesutului *grefat* într-o mică adâncitură „săpată" în fragmentul utilizat ca *portaltoi.* Această metodă, imaginată de *Camus* (1943) pentru *grefarea* de muguri, poate fi utilizată pentru amplasarea în adâncitura respectivă a unui implant tisular de origine și natură variată, de regulă de formă conică, ce este aplicat în orificiu creat în *portgrefon*, ca un „pivot". Excavația în care urmează să fie amplasat *grefonul* trebuie să aibă o formă asemănătoare cu zona bazală a *altoiului.*

Grefările *in vitro* sunt practicate, cu precădere, la speciile lemnoase; în ameliorare, vitrografele sunt efectuate și la speciile ierboase.

În general, în vitrografări (fig. 22) imobilizarea celor doi parteneri implicați în *grefare* nu este, întotdeauna, obligatorie. Dar, *Gautheret* (1959) recomanda – după cum am menționat anterior – legarea partenerilor cu fir steril din lână (mai nou, imobilizarea partenerilor implicați în procedura de grefaj se face cu clipsuri din silicon, autoclavabil – n.n.).

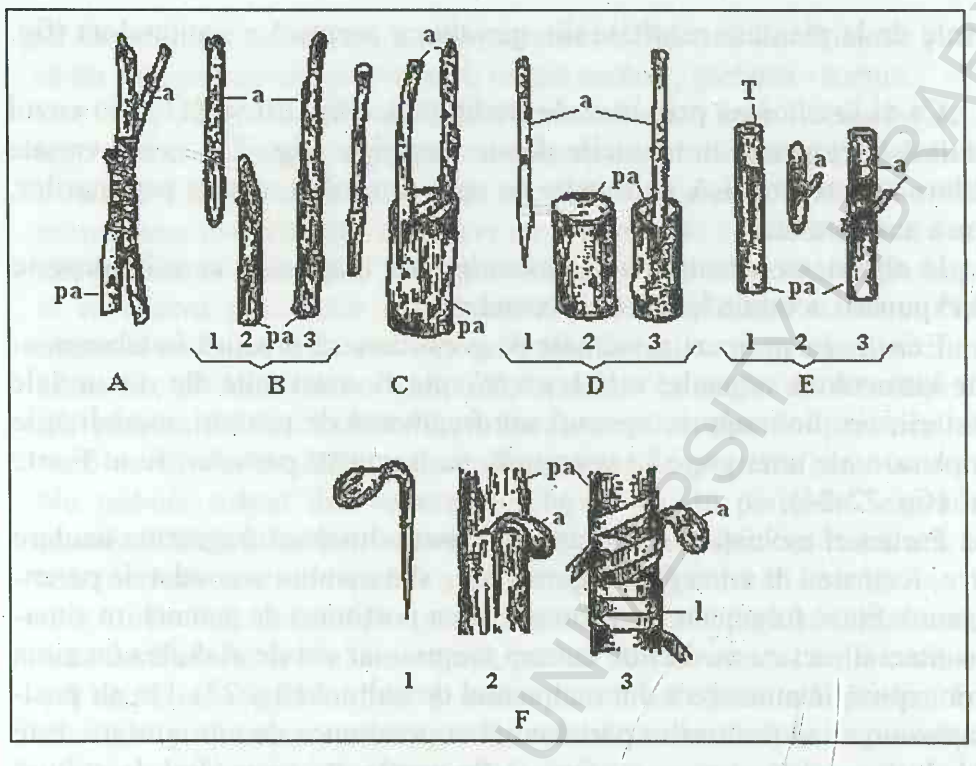


Fig. 20. Modalități clasice de altoire: A – prin apropierea și legarea a două ramuri tinere; B – prin alipirea a doi butași; C – altoirea în despicătură; D – altoirea sub coajă; E – altoirea în ochi (a – altoi sau grefoni; pa – portaltoi; c – portaltoi grefat); F – altoirea de semințe încolțite; T – tăierea scoarței portaltoiului în forma literei „T" sau în semilună; 1 – legături de fixare (pozițiile: 1 - altoiul; 2 – portaltoiul; 3 – altoiul grefat pe portaltoi).

Fig. 21. Variați cultivari de cactuși grefați pe un portaltoi de *Cereus*.
www.alibaba.com/product_gs/50343901/Cereus_tetragonis_Fairy_Castle_cactus_Acanthocereus

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

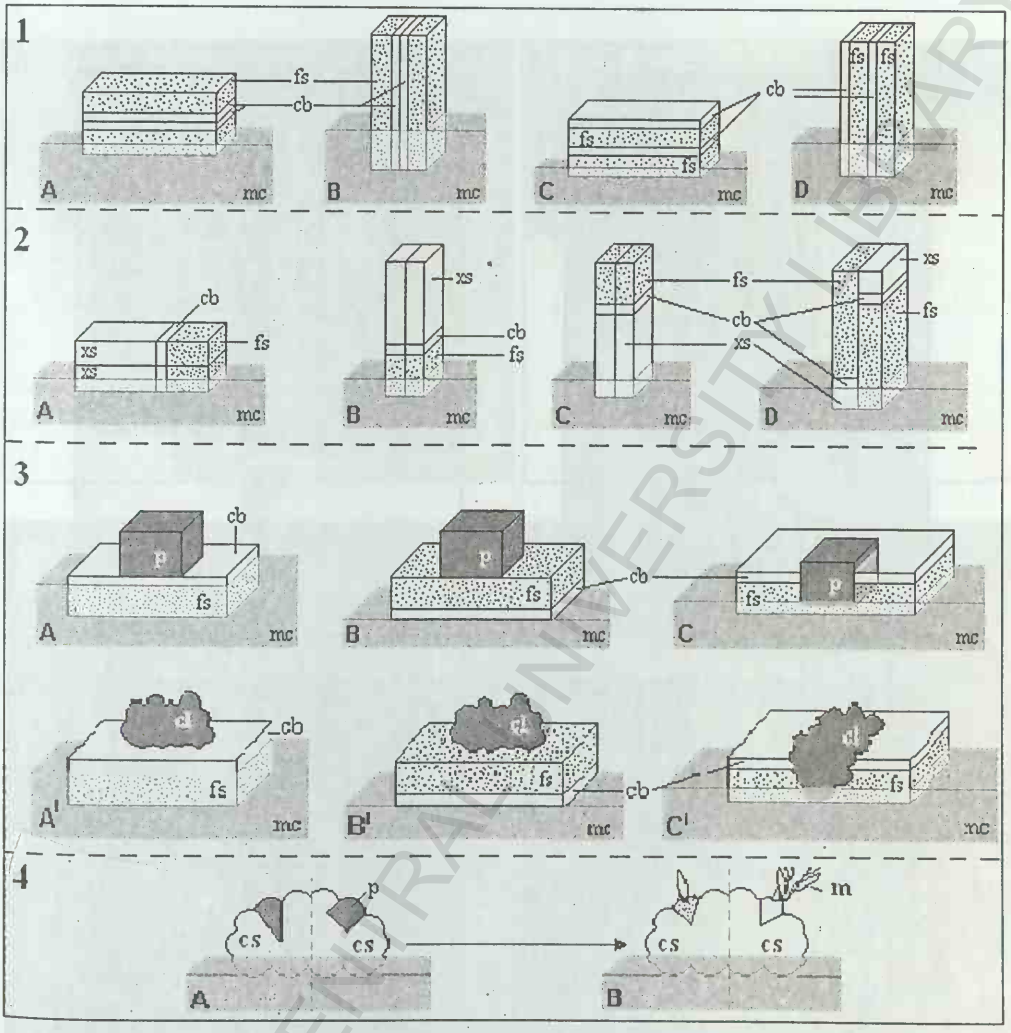


Fig. 22. Microgrefe practicate *in vitro*. **1.** grefe izomorfe constând din două fragmente omoloage ca structură și apartenență, (A-D – variate moduri de asociere a unde: fs=floem secundar; cb=cambiu; mc=mediu de cultură); **2.** grefe izomorfe, cu țesuturile similare în contact direct (A-C). A-orientate paralel cu mediu; B-cu polaritate inversată; C-cu polaritate normală; D-unul dintre fragmente are polaritate normală, iar celălalt are polaritate inversată; floemul secundar se află în contact direct doar în zona centrală (xs=xilem); **3.** heterogrefe/heteromorfe cu explant parenchimatic amplasat pe un fragment de floem secundar, de cambiu (cb) unde: A-cubul de parenchim (p) se află la interfața de contact cu cambiul; B-cubul de parenchim se află la interfața de contact cu parenchimul; C-cubul de parenchim implantat în portgrefon, după ce s-a dislocat o parte din cambiu și din floem; A'-C' reluarea experimentului cu țesut calusal (cs), în loc de parenchim; **4.** grefarea de parenchim în calus (A), sau de muguri (m) (B).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

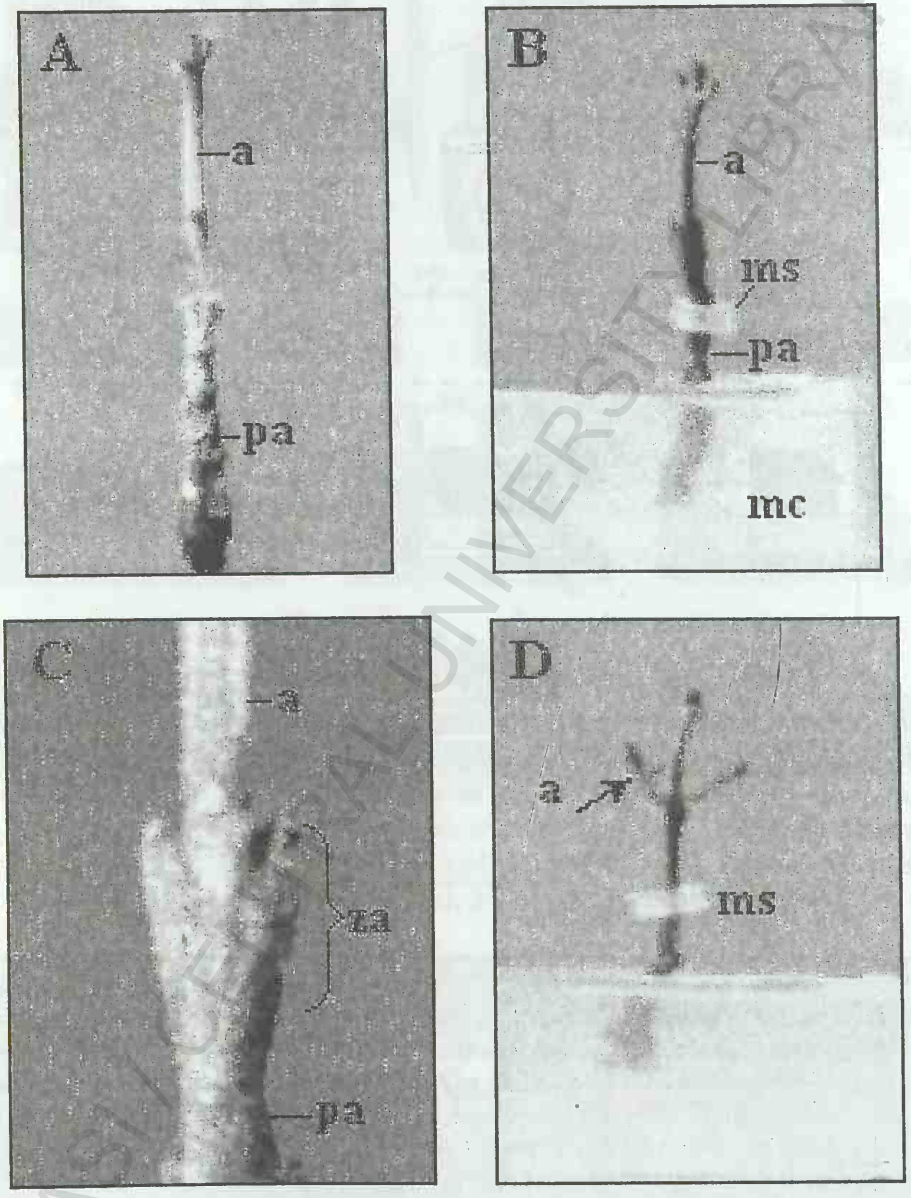


Fig. 23. Tehnica de microaltoire a unui microbutaș, pe un minilăstar de măslin (*Olea europaea* L.) și vitrocultivarea lor (după *Cardenal* și colab., 2008, prelucrată de noi). A – altoire în despicătură: pa – portaltoi; a – altoi; B – portaltoi amplasat *in vitro*; în zona de grefare, altoiul a fost imobilizat pe portaltoi cu un manșon din silicon, autoclavabil (ms); C – zona de altoire (za), detaliu, după 15 zile de la operarea grefării; D – aspectul altoiului, după 60 de zile de la efectuarea grefei.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

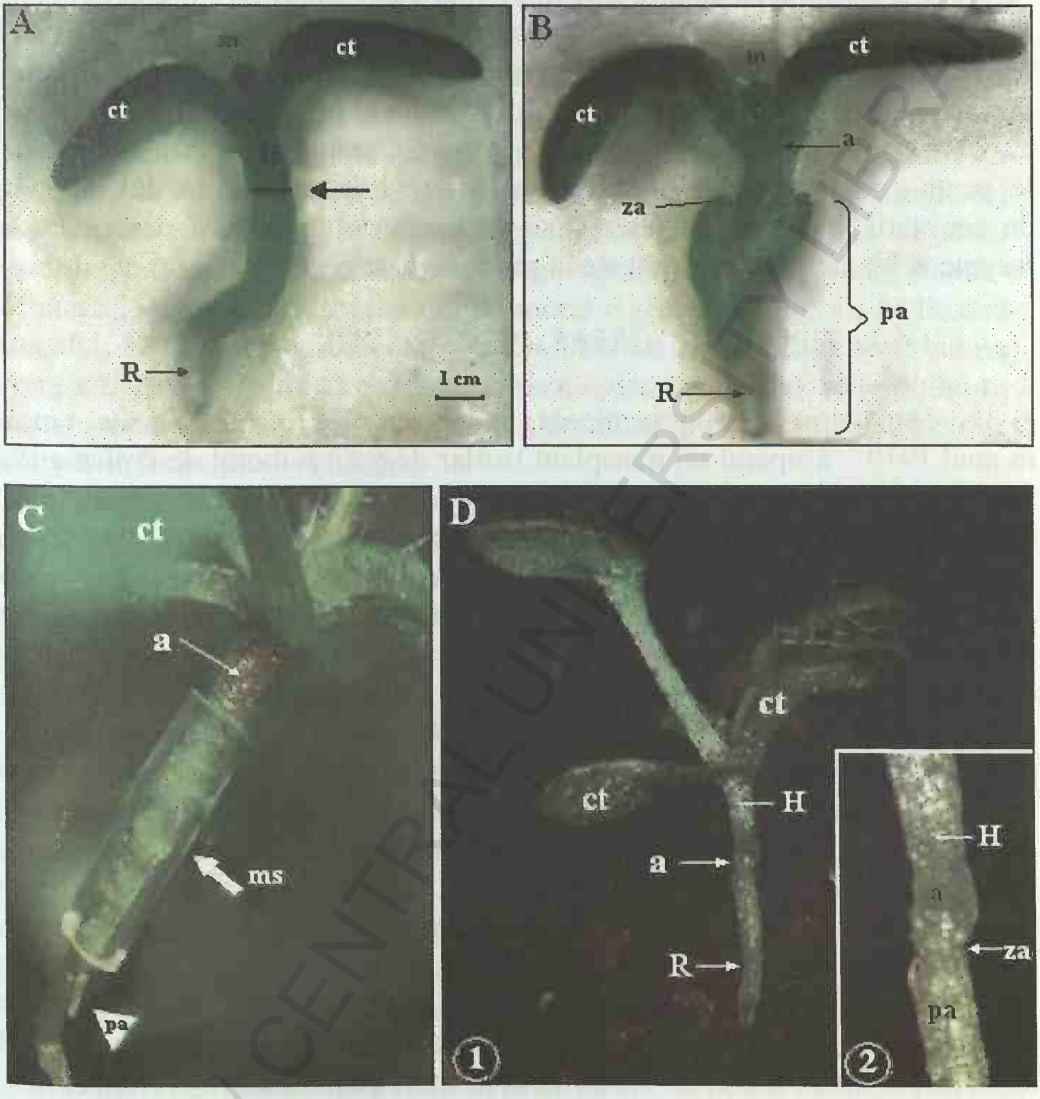


Fig. 24. Tehnica de microaltoire a unei plantule de *Arabidopsis*, efectuată în regim aseptic (după *Turnbull* şi colab., 2002, imagine prelucrată de noi). A – plantulă provenită din mediu steril (săgeata indică locul de secţionare a plantulei pentru explantarea altoiului); B – amplasarea apexului plantulei – din fig. A – pe un portaltoi constituit dintr-o plantulă deposedată de apex, dar care are atestat de „liber de infecţii" fitopatogene; C – zona de altoire (za) este consolidată cu un manşon de silicon (ms) autoclavabil; D – aspectul hibridului vegetativ realizat după altoire (1); 2 – detaliu al zonei de suturare a altoiului pe portaltoi (alte abrevieri: a – altoi; ct – cotiledoane; H – hipocotil; m – muguraş; pa – portaltoi; R – rădăcină).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu excepția cazului în care ambii parteneri supuși *grefării* provin din cultură aseptică, explantele care urmează să fie cocultivate, în scop de grefare, și care derivă dintr-un material vegetal septic, trebuie sterilizate după una din procedurile descrise de noi în primul volum al prezentului tratat (*Cachiță*, 2004); apoi, din materialul vegetal asepsizat, amplasat în cutii Petri sterile, pe un strat de hârtie de filtru axenică – în perimetrul hotei cu flux laminar de aer steril, pusă în funcțiune – se va opera delimitarea și desprinderea fragmentelor care vor fi implicate în procedura de *grefare*.

1.6.3. TIPURI DE *GREFE* PRACTICATE „*IN VITRO*"

După cum am mai menționat, în subcapitolul 1.4.1.2., *Jensen* – încă în anul 1910 – a operat un transplant tisular de țesut tumoral de *crown-gall*, în plante normale de sfeclă de zahăr și a constatat că celulele grefate au transmis boala canceroasă celulelor normale, sănătoase.

O grefă viabilă a fost realizată, cu succes, de către *White* și *Braun*, în anul 1942, la floarea-soarelui. Ei au amplasat, într-o tulpină sănătoasă de floarea-soarelui, un fragment dintr-o colonie de țesut tumoral de crown-gall, aparținătoare aceleiași specii.

Gautheret (1959) a obținut *heterografe* viabile, încă în anul 1943, prin proceduri practicate *in vitro*, cocultivând fragmente constând din țesuturi de salcie și de plop; în schimb, au eșuat încercările de grefare efectuate de el, în care a utilizat țesuturi de soc și de arțar, care alipite fiind, după un timp, treptat s-au necrozat.

Camus (1943-1949) a studiat consecințele *grefării* de muguri de andive, pe diferite tipuri de explante; *grefarea* acestora pe rădăcini cultivate *in vitro* nu a condus la întregistrarea de reacții clare, din partea partenerilor. În cazul în care mugurii au fost *grefați* pe fragmente de frunze, aceștia – la locul de executare a grefei – au generat țesuturi asemănătoare acelora corespunzătoare unei neogeneze de mugurași. Atunci când grefarea mugurașilor s-a făcut în apropierea unei zone meristematice, la locul de inserție s-a observat declanșarea unor procese de diferențiere, soldate cu formarea de elemente vasculare, xilemice. La liliac *(Syriga),* în cazul în care grefarea s-a realizat în apropierea țesutului floemic sau xilemic, s-a observat o diferențiere a țesutului vascular.

În anul 1948, *Camus* și *Gautheret* au publicat două articole științifice care se refereau la succesul înregistrat de către ei în creșterea exuberantă a unui *grefon* de țesut de *crown-gall*, de *Scorzonera hispanica* (iarba lui Tatin), în condițiile amplsării lui pe fragmente de rădăcini aparținătoare aceleiași specii; în timp, același experiment, efectuat cu țesuturi sănătoase, a

BCMA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

făcut ca evoluția *grefonului* să staționeze și treptat el să devină inert. Dacă a fost grefat țesut *anergic* (*habituat*), celulele acestuia au manifestat o reacție ambiguă, modificându-și comportamentul, dobândind aptitudini proliferative.

Între anii 1947-1948, *Ropp* a *grefat* fragmente de țesut de *crown-gall*, care în antecedență a suferit numeroase repicări, pe segmente de tulpină de floarea-soarelui. În decursul repetatelor repicări, celulele vitrocultivate, treptat, s-au eliberat de infecția cu *Agrobacterium* (pe care inițial o dețineau), iar sub influența țesutului tumoral – *grefat* pe tulpinile de floarea-soarelui, în imediata apropiere a *grefonului* – s-a proliferat un țesut calusal compact, care a prezentat o structură histologică asemănătoare țesutului tumoral grefat. Această tumoră, cu aspect de calus, în interiorul ei a dezvoltat o masă de formațiuni vasculare.

Braun și *Morel* (1950) au *grefat*, cu succes, colonii tisulare de viță-de-vie pe tulpini normale; atunci când țesuturile au fost transplantate *in vitro*, pe fragmente caulinare, normale, provenite din colonii *anergice*, *grefele* respective au generat o slabă activitate tumorogenă, în timp ce *grefe* de țesut tumoral, de tip *crown-gall*, implantate unor țesuturi caulinare, normale, au declanșat în zona respectivă o tumorogeneză foarte puternică..

Limasset și *Gautheret* (1950) au grefat, pe tulpini de tutun, țesut tumoral (de *crown-gall*) sau *anergic*, tot de tutun, generat în urma cultivării *in vitro* – timp mai îndelungat – a unui țesut normal, pe un mediu de cultură care a deținut o concentrație ridicată de AIA. *Grefele* au dat naștere la tumori, care au fost mai mari în volum la *grefa* constând din țesut anergic, decât la tumora provocată fiziologic, de *grefa* practicată cu țesut tumoral generat de *Agrobacterium tumefaciens*. Cu toate acestea, *Henderson* (1954) a subliniat faptul că, cele două tipuri de țesuturi tumorale au proprietăți similare.

Morel și *Martin* (1952) au obținut plante de păr și de măr, libere de viroze, prin grefarea apexurilor virusate pe portaltoi sănătoși. *Morel* și *Martin* (1952), prelevând și vitrocultivând meristeme de dalie, excizate de la plante virusate, au obținut *in vitro* lăstari cu talia de 1 -2 cm, dar lipsiți de rădăcinițe; însă, prin *grefarea* lor pe plantule sau plante tinere, libere de viroze, s-au obținut plante sănătoase. Ulterior, acest experiment a servit ca model în obținerea de plante sănătoase, la numeroase specii vegetale.

Pe de altă parte, pentru a studia inducția histogenă, la nivelul fitoinoculilor de morcov, *Rodkiewicz* (1952) a efectuat un experiment de *grefaj,* în regim de vitrocultură, care a constat din suprapunerea peste fragmente de țesut libero-lemnos secundar, de morcov, prelevat din rădăcini metamorfozate, a unor explante similare, orientate însă cu polaritatea inversată. Între

lemnul și liberul secundar existând un cambiu intrafascicular, după o perioadă de vitrocultură, din cambiu s-a regenerat calus; calusurile fiecărui fragment, în parte, s-au sudat în zona lor de contact, acestea formând nu numai o masă comună de calus, ci și un cordon vascular constând din traheide, neoformate în zona corespunzătoare xilemului secundar.

În anul 1955, *Louis*, a obținut o *autografa* reușită, care a constat dintr-un implant de muguraș – prelevat de la o plantulă de mazăre – pe rădăcinița aceleiași plantule.

În ceea ce privește histogeneza, în zona de contact a *grefei* cu *portaltoiul*, *Wetmore* și *Sorokin* (1955) au constatat că o colonie tisulară, generată din fragmente caulinare de liliac (*Syringa*), din punct de vedere histologic a fost omogenă, în masa sa foarte rar diferențiind traheide. Dacă în colonia tisulară rezultată, s-a *grefat* un mugure de liliac, după un timp de vitrocultură s-a constatat faptul că, în profunzimea masei de celule (la circa 9 mm de la locul de inserție al mugurelui) *grefonul* a determinat formarea de fascicule libero-lemnoase. Un rezultat asemănător a fost obținut de către ei și în urma *grefării*, pe liliac, de mugurași de *Ligustram vulgare* sau de *Fraxinus americana*, ori de alte genuri vegetale.

După cum se poate deduce din schema prezentată în figura 22, în vitroculturile vegetale tipurile de *grefe* sunt foarte variate, existând o multitudine de combinații posibile, în funcție de ce reacție dorim să studiem și să analizăm. În general, este vorba despre *heterografe*.

În *grefologie*, foarte mult contează proveniența *grefonului*, dacă acesta derivă din natură sau din vitrocultură, starea de sănătate a partenerilor supuși fuzionării, precum și particularitățile lor de structură morfoanatomică; de exemplu, segmentul *grefat* poate consta din două tipuri de parenchim, sau poate fi constituit din alte două tipuri de țesuturi, ori din calus – normal sau tumoral – ori din țesut cambial, atașat fie de floem, fie de xilem secundar etc.; fragmentele grefate pot avea mărimi identice cu *portgrefonul*, sau pot fi de dimensiuni diferite; amplasarea partenerilor pe mediul de cultură poate fi făcută cu axa lungă în paralel cu suprafața substratului, adâncind sau nu în mediu fragmentele asociate, ori dacă țesuturile dețin cambiu, cu acesta situat la nivelul mediului sau la o mică distanță de el; apoi, forma celor două fragmente asociate poate fi variată, ele având fie baza patrată, fie dreptunghiulară, sau acestea pot fi fasonate în formă de ic; pe o bază dreptunghiulară ori cubică se poate amplasa un grefon de formă și mărime similară sau diferit ca dimensiune și morfologie etc. (fig. 22).

BIBLIOTECA UNIVERSITARĂ

1.6.3.1. Vitrografele – obiective investigate

La plante, operațiunile de *grefare in vitro* se fac, cu precădere, în scop experimental, urmărindu-se elucidarea unor aspecte cu caracter teoretic, cum ar fi cele de compatibilitate sau de incompatibilitate între parteneri, capacitatea regenerativă, morfogeneza, efectele regulatorilor de creștere etc. În grefologia vegetală se pot studia reacțiile de fuzionare sau de respingere ale partenerilor implicați în procesul de *grefare,* în funcție de natura organelor, tipurile de țesuturi conținute în *grefon*, aflate în contact direct sau situate mai departe de zona traumatizată, în corelație cu sezonul, respectiv cu faza de vegetație în care s-au aflat plantele mame în momentul prelevării explantelor, vârsta lor, consecințele respectării sau a nerespectării polarității fitoinoculilor asociați, raporturile de mărimi, fitohormoni conținuți în mediile de cultură ș.a.m.d. În astfel de studii un rol important îl joacă și condițiile ecofiziologice din camera de creștere.

În *grefologie*, după cum am mai menționat, aspectele cercetate vizează și utilizarea *grefelor* în experimente ce privesc elucidarea modului în care are loc transmiterea bolilor, la plante, în special a celor de natură neoplazică și, în acest context, alterarea unor parametrii biochimici, fiziologici și de creștere, în cazul diferitelor combinații experimentale realizate prin intermediul practicării unor astfel de proceduri.

În studiile de morfogeneză experimentală sunt urmărite fenomenele surprinse în zona de suturare tisulară, în aria de contact între cei doi parteneri, precum și procesele de diferențiere și de organogeneză, în dependență de influențele exercitate din exterior asupra diferitelor celule și țesuturi implicate în *grefare* etc. Un alt obiectiv avut în vedere este și acela al studierii modului de desfășurare sau de alterare a principalelor procese fiziologice (proliferarea celulară, circulația sevei, creșterea partenerilor) și biochimice, care se petrec la nivelul celor doi asociați.

In ameliorarea plantelor, de un interes deosebit se bucură tehnicile de *microgrefare* (*microaltoire*) *in vitro*, mai ales în pomicultură și în silvicultură. La esențele lemnoase, tehnicile de *microaltoire in vitro* joacă un rol important nu numai în virusologia vegetală (în studierea infecțiozității virusurilor, a reacțiilor de propagare a infecțiilor fitopatogene, în general, și a celor virale, în special, cu obținerea de plante libere de viroze), ci și în înmulțirea – prin *altoire* – a plantelor cu caractere nobile, utilizând ca *portaltoi* subiecți neameliorați, dar care dețin calități deosebite în ceea ce privește rezistența lor la boli, ori la variați factori de stres etc.

Grefările în vitrocultură se referă la asocierea a doi, mai rar a trei parteneri, ce urmează să conviețuiască în regim de cocultură și să interrelaționeze.

Vitroaltoirile pot fi practicate după modelul celor tradiționale, în scopul obținerii de vitroplantule *libere de viroze*, care să fie aclimatizate la regimul de viață *ex vitro*, fie pentru a mijloci o juvelinizare a meristemelor apicale „îmbătrânite".

În general, în cazul operațiunilor de *grefare* șansele de reușită sunt mai mari dacă *grefonul* de bază (cu rol de *portaltoi*) este inoculat pe mediul de cultură cu circa 1-2 săptămâni înaintea asocierii lui cu viitorul țesut partener. În studiile de compatibilitate ale partenerilor pot fi făcute experimente cu explante tisulare variate, prelevate de la o aceeași specie, ori de la specii și organe diferite, sau de la organe și țesuturi similare etc.

Pentru facilitarea inițierii, stimulării și a susținerii proceselor regenerative, poate fi administrat – prealabil aplicării *grefonului*, pe un segment de țesut deja acomodat la regimul de viață *in vitro* – un tratament fie cu o soluție de auxină, fie cu citochinină, fie soluția de regulatori de creștere poate fi administrată la nivelul fragmentului care urmează să fie *grefat*. Pe parcursul avansării proceselor de asociere a celor doi *grefoni*, se pot face examinări histologice, în scopul evaluării – în decursul timpului – a naturii relațiilor care se stabilesc între cei doi parteneri, atât din punct de vedere structural, cât și histoenzimologic.

Toate observațiile rezultate, trebuie corelate cu aspectele referitoare la dimensiunea fragmentelor, gradul lor de interconectare în decursul timpului, procesele de histo-și morfogeneză ce se produc, în funcție de mediile pe care partenerii asociați cresc, în regim de vitrocultură, în dependență de balanța hormonală administrată în substrat etc.

În cursul montării experimentelor de *grefare* este important să se țină seama nu numai de orientarea polară a țesuturilor implicate în procesul de asociere, ci și de locația acestora în cadrul organului de proveniență, întrucât se vor înregistra diferențe de reacție în funcție de zona organului din care *grefonii* au fost explantați, respectiv dacă ei provin din vârful, centrul sau de la baza organului.

Menținerea turgescenței țesuturilor grefonului este facilitată de umiditatea atmosferică și de substanțele exudate la nivelul excavației practicate în fragmentul utilizat ca *portgrefă*, lichid care scaldă partea inferioară a *grefonului* și acționează benefic asupra acestuia, favorizând realizarea joncțiuniii celor două țesuturi partenere; excepție de la această situație fac fragmentele incompatibile.

Multe proceduri de *grefare*, practicate *in vitro*, operează cu explante caulinare, apicale, ori cu mugurași recoltați de la plantulele provenite din germinarea aseptică a semințelor, sau cu mici lăstari care au fost detașați împreună cu o parte din țesuturile care le-au dat naștere; în cazul explantelor apicale, sau a celor care sunt prelevate de la nivelul unei culturi realizate *in vitro* (fie un segment caulinar sau un fragment de frunză, fie de pețiol, de rahis sau de peduncul floral, ori țesuturi recoltate de la suprafața sau din profunzimea unei mase de calus etc.), desprinderea *grefonului* trebuie făcută astfel încât acesta să aibă atașată de el o parte din țesutul bazal, pe care ei s-au format.

Evident că, pentru recoltarea de apexuri de plantule, germinarea materialului semincer trebuie să fie făcută în condiții aseptice, ori plantulele să provină din culturi de embrioni zigotici, sau somatici (*Deliu*, 2008). În astfel de cazuri, materialul biologic în prealabil trebuie asepsizat; apoi, el trebuie spălat – de repetate ori – cu apă distilată, sterilă, și abia în final, boabele (sau embrionii desprinși din acestea), pot fi inoculați pe un substrat solid (mediu de cultură, agarizat), sau pe un un mediu lichid, embrionul fiind amplasat pe un suport, de exemplu pe punte din hârtie de filtru. În general, substratul va fi constituit dintr-un mediu mineral, complex (de exemplu *Murashige-Skoog,* 1962), diluat la jumătate, întrucât în cazul semințelor, a achenelor, ori a cariopselor, embrionii dețin neafectate țesuturile lor de rezervă. Pe astfel de medii, embrionii zigotici explantați sau cei somatici pot germina și pot genera plantule.

În cazul în care *grefonul* constă din *apexuri* caulinare, constituite din domul meristematic, împreună cu două sau trei perechi de primordii foliare, mugurele donator de astfel de explante trebuie asepsizat, în prealabil, potrivit procedurilor obișnuite de sterilizare ale materialului vegetal (*Cachiță*, 2005). Un astfel de *grefon* poate fi amplasat fie pe un fragment aflat deja în vitrocultură, având dizlocat un făgaș care să corespundă modului de fasonare practicat în zona bazală a apexului (fig. 23), fie, el poate fi aplicat în locul *mugurașului* sau al apexului, însoțit de cele două cotiledoane, având atașați circa 2-4 mm din hipocotilul plantulei generate din embrionul seminței germinate în condiții aseptice. O astfel de procedură este utilizată mai ales în practicile operate în metodele de vitrocultură a speciilor lemnoase (fig. 24). Apexurile, mugurașii sau lăstarii, după desprinderea acestora de la locul lor de origine, pot fi *grefați* pe fragmente aflate *in vitro*, cu rol de *portaltoi* (fragment care este recomandabil să dețină cambiu sau țesut proliferativ), aflate în cultură primară, sau în subcultură sau care pot fi *grefate* pe un țesut parenchimatic. În toate situațiile descrise anterior, trebuie să se țină seama că atât *portaltoiul* (*portgrefonul*), cât mai ales fragmentul *grefați*

posedă o constituție delicată, iar o desicare a celulelor acestora poate compromite capacitatea lor regenerativă și, în consecință, reușita operațiunii de *grefare*.

În general, procedurile de vitrografare sunt dificile, din cauza micimii explantelor, mai ales în cazul *grefonilor* de tip apex. Pe de altă parte, vitro-manipulările sunt riscante și din cauza pericolului permanent de contaminare a materialului biologic cu germeni saprofiți, proveniți din atmosferă.

Șansele de „prindere" a *grefelor*, de orice tip, sunt cu atât mai mari, cu cât zonele meristematice ale *portgrefonului*, cu cele ale fragmentului *grefat* se află în contact direct și au în structurile lor meristeme primare sau secundare.

În anul 1953, *Doorenboos* (după *Monteuuis* și *Dumas*, 1990) a semnalat faptul că, prin *altoirea* ramurilor bătrâne de *Hedera helix*, pe plantule rezultate din semințele speciei respective a obținut o întinerire a *grefonului*, fenomen atestat, ulterior, experimental și la alte specii lemnoase, de către *Cauvin* (1982) și de *Franclet* (1983). *Franclet* (1979 și 1989) a obținut – la un eucalipt de 83 de ani – o reîntinerire a meristemelor „îmbătrânite", prin grefarea lor *in vitro* pe *portgrefe* constând din plantule provenite de la semințe recoltate de la exact aceeași plantă, măsură luată pentru a se preîntâmpina orice fenomen de respingere. După șase luni a repetat operațiunea de grefare și abia după trei serii de regrefări succesive s-a atins vigoarea și juvenilitatea plantei regenerate din meristemul inițial, asemănător plantulelor provenite din embrionul seminței. Alteori, între *altoi* și *portaltoi* (atât *in vitro*, cât și *in vivo*) se poate interpune o lamelă din agar, care să conțină, de exemplu AIA 1 mg/l. El a procedat și la o operare în cascadă a grefărilor, etape în care a căutat să micșoreze din ce în ce mai mult dimensiunea *grefonului*. Prin cercetările lui s-a confirmat faptul că, *microgrefarea* meristemelor apicale, caulinare, conduce la o „rejuvenilizare"a acestora, cunoscut fiind faptul că la arborii bătrâni aceste meristeme suferă un proces de „îmbătrânire", fenomen care nu a fost încă în suficientă măsură elucidat, din punct de vedere teoretic. Acest proces este mai accentuat la speciile de rășinoase.

În anul 1979, *Boulay* a semnalat faptul că, explantele prelevate de la plante adulte de *Sequoia sepervirens*, *grefate* și regrefate pe plantule mărește viteza de rizogeneză a plantelor rezultate în urma reușitei acestei operațiuni, precum și bogăția sistemului radicular realizat în timp.

Tehnica de *microgrefare* a meristemelori caulinare, primare, a fost pusă în aplicare la *Sequoiadendron giganteum*, de către *Monteuuis* (1986-1987), utilizând explante prelevate de la arbori în vârstă de 100 de ani. Mai

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

apoi, tehnica respectivă a fost extinsă, cu succes, şi la alte specii de conifere (după *Monteuuis* şi *Dumas*, 1990). Astfel, din punct de vedere tehnic, meristeme primare, recoltate din vârful ramurilor arborilor seculari de *Sequoiadendron giganteum, Pinus pinaster, Picea abies, Pseudotsuga menziesii*, precum şi de alte specii, având o talie de sub 400 μm, alcătuite fiind din domul meristematic şi câteva primordii foliare, şi *grefate* pe plantule provenite din seminţe germinate în regim aseptic, suferă un proces de întinerire. După aproximativ 40 de zile de la executarea operaţiunii de *grefare*, s-a procedat la aclimatizarea hibridului vegetativ obţinut postgrefare, la condiţiile vieţii *ex vitro*.

Aclimatizarea exvitroplantulelor se poate realiza într-un substrat constând dintr-un amestec – în părţi egale – alcătuit din turbă, vermiculit (sau perlită) şi compost.

După cum am mai specificat, explantul apical poate fi *grefat* ca atare, sau acesta poate fi prelucrat – mai ales la speciile lemnoase – cu regulatori de creştere (de exemplu cu citochinină) sau cu antioxidanţi, întrucât în porţiunile traumatizate, prin secţionare, aceasta suferă un stres oxidativ, prin prezenţa în zona lezată a unor enzime oxidante – oxidazele (polifenoloxidaza, peroxidaza şi catalaza) – fenomen care poate compromite, într-o măsură mai mare sau mai mică, procesele de regenerare, respectiv de suturare a ţesuturilor din zonele secţionate, odată puse în contact în cadrul operaţiunilor de *grefare* (*altoire*). În afara metodelor menţionate anterior, la locul de altoire pot fi aplicate şi tratamente cu acid ascorbic, ori cu *dietilditicarbonat de natriu* (DIECA) în concentraţie de 2 mg/l (*Jonard* şi colab., 1983).

McCown (1988) a constatat că, prin *grefarea* de microlăstari, pe plantule care au provenit din germinarea aseptică a seminţelor, microbutaşii desprinşi de pe astfel de vitroplantule *înrădăcinează* mai bine, procentul de reuşită fiind de aproape 50%, mai ales dacă, în timp scurt sunt operate succesiv, mai multe astfel de grefări.

Altoirea unui apex excizat, pretratat cu antioxidanţi, poate fi operată atât *in vitro*, cât şi *in vivo*, la nivelul unor *portaltoi* de 40-160 de zile, cultivaţi în seră. După *altoire* (grefare) planta poate fi păstrată timp de 5-7- zile la întuneric, după care aceasta va fi trecută la lumină cu o intensitate variabilă de 350 lucşi în primele două zile şi de 780 lucşi următoarele două zile, iluminarea continuând apoi cu o intensitate de 100 de lucşi, în regim de 16 ore lumină/zi.

Procedura de grefare a apexurilor prelevate de la copaci multiseculari este operaţională şi se constituie într-o măsură salvatoare în clonarea speciilor arboricole, valoroase. În plus, pe această cale, la pomii fructiferi,de

exemplu la piersic, au fost obținute exemplare sănătoase, libere de virusuri, în procent de 100%, în ceea ce privește virusul CLSV (*Maxim*, 2002). Atât timp cât plantulele altoite se află *in vitro*, ele pot fi minibutășite, procedură prin care se micropropagă (vegetativ) clonele libere de viroze, tehnică larg răspândită în Franța (*Monteuuis* și *Dumas*, 1990), la arbori și la pomii fructiferi.

De dată recentă (*Herman*, 2009), fenomenele de *alelopatie* au început să fie studiate – din punct de vedere teoretic – și prin intermediul tehnicilor de culturi de țesuturi și celule vegetale. În ultimii ani, ne-am pus și noi problema efectuării de cerceări experimentale în direcția analizării interacțiilor posibil de stabilit între diferiții fitoinoculi aflați în regim de cocultură.

Termenul de *alelopatie* a fost lansat de către botanistul german *Molisch*, în anul 1937. El derivă din grecescul „allelon" = altul și „pathein" = suferință. Acest termen definește influența exercitată de o plantă asupra germinației, creșterii și dezvoltării altei sau altor plante, aflate în vecinătatea acesteia. De regulă, în natură, între plantele aflate în vecinătate, într-un anumit areal, se ivesc fenomene de concurență, în raport cu spațiul de viață de care ele au nevoie, de necesarul lor față de resursele naturale de apă, de nutrienți, accesul la lumină etc. În general, cel mai adesea, între diferitele specii vegetale, există reacții de respingere, ca urmare a eliminării (desorbirii) în mediul înconjurător a unor alelocompuși, care acționează ca factori de selecție în ecosistemul din care fac parte diferitele plante ce se învecinează, inhibând germinația, creșterea și dezvoltarea altor plante, din apropierea lor. Reacțiile alelopatice sunt observate mai ales între genuri variate, dar și intraspecific, situație în care fenomenul este denumit autotoxicitate. Alteori, mai rar, există și reacții pozitive, interspecii sau intergenuri (*Reigosa* și *Pedrol*, 2002).

Astfel de reacții sunt important de luat în considerare, mai ales în cazul covoarelor vegetale care alcătuiesc peluzele parcurilor, selecția speciilor floricole combinate făcându-se și în funcție de toleranța sau intoleranța acestora, unele față de altele.

Interrelaționarea sau respingerea dintre speciile vegetale, l-au determinat pe *Knapp* (1950) să denumească astfel de studii ca un fenomen de „socializare a plantelor superioare"; experimental, el a urmărit efectele exudatelor radiculare acumulate în culturi hidroponice, asupra rizosferei altor plante.

În acest context, și noi am organizat două experimente constând în *cocultivarea*, respectiv asocierea, în regim de vitrocultură a calusului *hiperhidric* de *Asparagus officinalis* (fig. 25A), fie cu explante apicale, caulinare, de *Opuntia* sp., prelevate din exemplare vitrocultivate, fie cu protocormi de *Cymbidium* (fig. 26A-D), o orhidee cu mare valoare comercială.

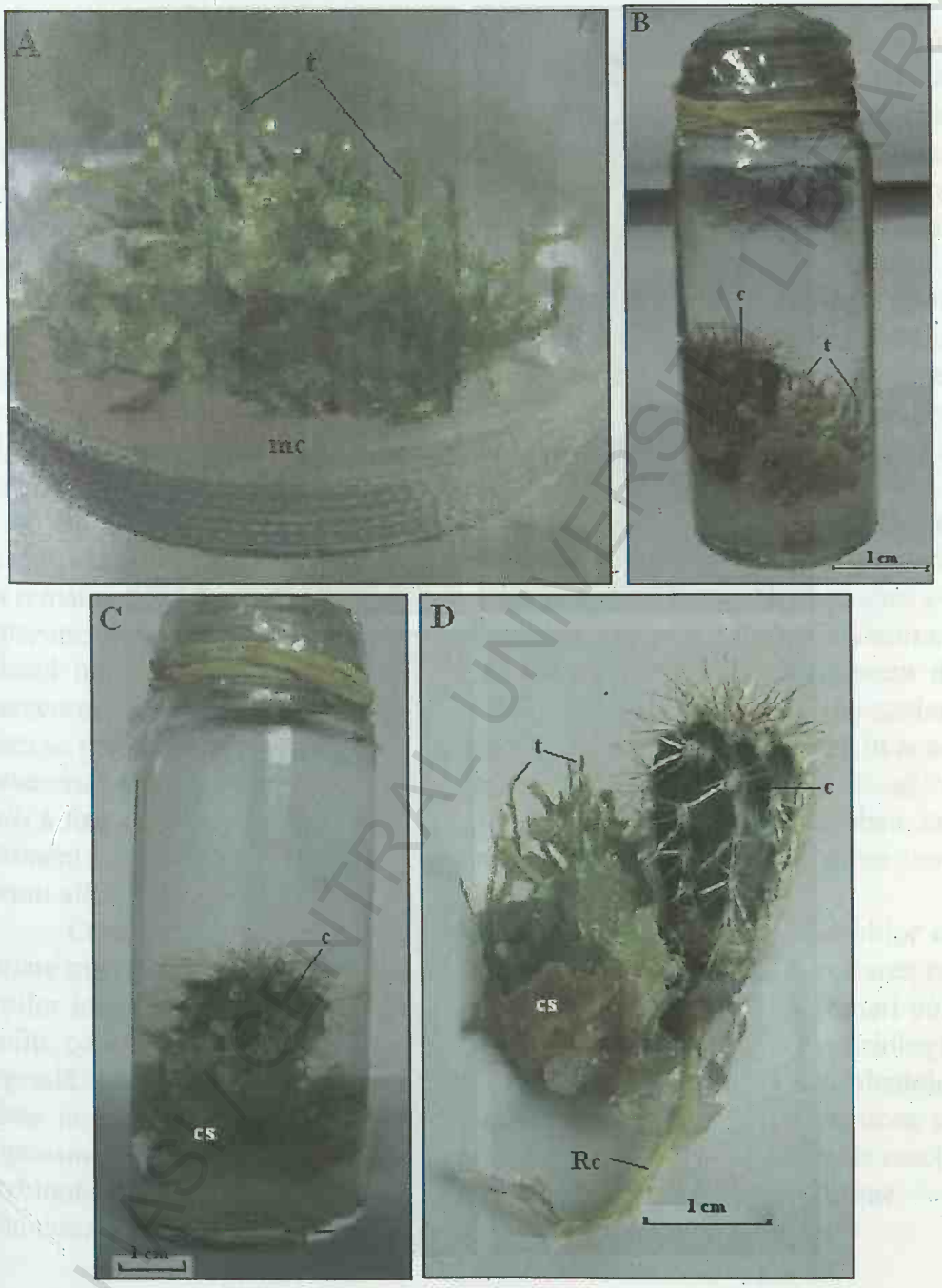


Fig. 25. Vitrocultură de calus *hiperhidric* de *Asparagus officinalis*, care are o puternică capacitate de lăstărire (A); B-C – calus pe care s-a grefat un fragment apical de cactus (*Opuntia* sp.), provenit din *vitro*; D – detaliu privind asociația realizată după 6 luni de la cocultivarea celor două specii ca parteneri (c – cactus; cs – calus de *Asparagus*; mc – mediu de cultură; Rc – rădăciniță de cactus; t – tulpinițe *Asparagus*).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 26. Vitrococultură de calus de *Asparagus officinalis* cu protocormi de *Cymbidium hy.* A – inițierea coculturii prin amplasarea protocormilor (pr) pe calus (ca); B-D – etape de conviețuire – în regim asociat – a celor două genuri partenere (t – tulpinițe de *Cymbidium*; mc – medii de cultură).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După cum rezultă din figurile 25 şi 26, parteneriatul dintre calusul de *A. officinalis* şi cactusul *Opuntia sp*, în regim de vitrococultură, aflate în strânsă vecinătate, timp de 6 luni au convieţuit excelent, fapt vizibil atât prin amploarea caulogenezei, cât şi în ceea ce priveşte colorarea de un verde intens a tulpinițelor; în cazul cactusului, la baza acestuia s-a remarcat chiar şi neogeneza de rădăcinițe, semn că cei doi parteneri cocultivați au convieţuit bine, neincomodându-se.

În cazul experimentului similar, întreprins cu protocormi de *Cymbidium hy.* (fig. 26), pe perioada de cocultură (6 luni) masa calusului de *Asparagus* a crescut, fără ca acesta să genereze tulpinițe; în schimb, orhideea *Cymbidium* şi-a sporit numărul de protocormi, parte dintre aceştia generând tulpinițe, ceea ce este un fapt pozitiv, întrucât neogeneza de formațiuni caulinare, la nivelul protocormilor, este un fenomen mai de durată.

În urma acestui experiment, *Cachiță* şi *Hurgoiu* (date nepublicate) au ajuns la concluzia potrivit căreia, la calusul *hiperhidric* de *A. officinalis* s-a remarcat o bună compatibilitate a acestuia cu cele două specii cu care s-a experimentat, dar că, în cocultura realizată cu protocormii de *Cymbidium*, calusul nu a regenerat tuplinițe, în schimb, la *Cymbidium*, neogeneza de protocormi şi formarea de tulpinițe, a fost considerabil stimulată (nu acelaşi lucru se poate afirma şi despre rizogeneză). Deci, reacția morfogenă în acest parteneriat a fost diferită, în funcție de specia cu care calusul de *A. officinalis* a fost asociat, în cocultură. De remarcat este şi faptul că, în ambele experimente partenerii nu s-au suturat, respectiv nu au fuzionat, ci au convieţuit alăturați fiind într-un acelaşi substrat de cultură.

Considerăm că, alături de studiile de cocultură ale fitoinoculilor cu variate microorganisme fitopatogene, simbionte sau saprofite, cercetarea reacțiilor înregistrate în condițiile asocierii *in vitro* a diferiților parteneri cormofiți, constituie o cale de îmbogățire a cunoştințelor ştiințifice de fiziologie vegetală, mai ales a celor referitoare la interrelaționarea țesuturilor plantelor aflate în situații particulare, care privesc îmbolnăvirea, lupta acestora cu organismele din imediata lor vecinătate, sau, dimpotrivă, stabilirea de reacții simbionte şi, nu în ultimul rând, practicarea – sub diferite forme – a tehnicilor de grefare.

BCU „M. EMINESCU" IAŞI BIOLOGIE

2. HIPERHIDRIA SAU VITRIFICAREA FITOINOCULILOR

2.1. INTRODUCERE

Fenomenul de *hiperhidrie*, proces morfofiziologic supranumit și *vitrificare*, respectiv *sticlozitate*, este rar întâlnit la nivelul organelor plantelor crescute în cadru natural, uneori acesta apărând sporadic, mai ales la unele legume cultivate în spații protejate, sau la fructele de tip poamă. Macroscopic, fenomenul de *hiperhidrie* constă într-o „*transparentizare*" a țesuturilor afectate de acest sindrom. În natură, ca și *in vitro*, *hiperhidria* se produce spontan.

Hiperhidria naturală, la plante (după cum preciza *Gautheret* în lucrările sale publicate în anii 1977 și 1980), a fost semnalată – încă din secolul IX – la frunzele de salată ale plantelor cultivate în sere.

Tot *Gautheret* a fost acela care a descris prezența fenomenului de *vitrificare* la unele vitroculturi vegetale. El a considerat că la fitoinoculi, pentru definirea aspectelor de *sticlozitate*, sau de *translucidítate*, ar fi mai potrivită utilizarea termenului de *hiperhidrie*, în loc de *vitrificare*, întrucât țesuturile suferinde de acest sindrom sunt „suprahidratate", consecință a infiltrării apei rezultate din exosmoză, în spațiile intercelulare ale organelor afectate de acest fenomen, substituind aerul din interstițiile lor.

La fitoinoculi, *hiperhidria* se produce în condiții ecofiziologice complexe, situație în care umiditatea în exces pare să constituie factorul determinant în demararea instalării procesului de *vitrificare* în țesuturile unor organe ale vitroplantulelor, sau chiar și în calus, fenomenul – din punct de vedere morfologic – exteriorizându-se printr-o relativă *transparentizare* a masei vegetale atinsă de această particulară și patologică stare fiziologică.

Cu toate că în natură, la plante, *hiperhidria* este un fenomen foarte rar întâlnit, uneori acest proces se manifestă, pe alocuri, la unele organe vegetale – nu numai la frunzele de salată și la poame (de exemplu, la mere și la pere) – ci și la rădăcinile tuberizate de ridichi, la fructele de tomate și de castraveți (la culturi efectuate în spații protejate), în pulpa bananelor sau a căpșunilor etc. La nivelul organelor, *hiperhidria* apare sub forma unor pete translucide, mai mult sau mai puțin extinse ca suprafață sau ca profunzime. După *Rugini* și colaboratorii (1987), apariția *hiperhidriei* în pulpa fructelor de gutui, în anii cu climat cald și secetos, se datorează instalării în intersti-

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

țiile parenchimului de rezervă al acestor poame a apei ce provine din vacuomul celulelor care alcătuiesc aceste țesuturi, întrucât în spațiile lor intercelulare se petrece o acumulare de sorbitol (substanță osmotic activă), în concentrații ridicate, fapt care provoacă producerea unui dezechilibru glucidic, local, ce declanșează un proces de desorbție a unei părți din apa sucului vacuolar și localizarea ei în perimetrul extracelular; aceasta conduce la evacuarea aerului din interstiții și, drept consecință, are loc o „transparentizare" a zonelor afectate de fenomenul descris (la mere, sau la pere, este posibil ca *vitrificarea* să se producă printr-un mecanism similar).

Fiziologic, procesul de *hiperhidrie* intervenit la nivelul țesuturilor vegetale regenerate și crescute în regim de vitrocultură pare să fie, în mare măsură, diferit de fenomenul respectiv întâlnit la organele plantelor din natură, cu toate că – din punct de vedere morfologic – ambele manifestări sunt similare, având ca rezultat *vitrificarea* țesuturilor; la fitoinoculi *hiperhidria* nefiind probabil provocată de cauze și mecanisme biochimice și moleculare identice cu cele manifeste în natură, pe plan celular și ultrastructural, în final, nu se ajunge la aceleași consecințe. Astfel, este posibil ca *hiperhidria*, la plante (cea naturală sau cea produsă *in vitro*), să aibă în comun doar procesul de „inundare" cu apă (provenită prin exosmoză) a spațiilor intercelulare ale unor țesuturi, situația creată conferind zonelor afectate de acest fenomen apariția aleatorie a aspectului de *sticlozitate*. Dar, la nivelul vitroculturilor vegetale procesele de *vitrificare* sunt mult mai complexe, întrucât în celulele afectate de acest fenomen este vorba despre producerea unor manifestări de tip ***canceros***, în timp ce, în *hiperhidria* naturală nu par să fie incriminate reacții celulare cu caracter *neoplazic*. Mai mult decât atât, în regim de vitrocultură, încă *Gautheret* (în anul 1942) a dovedit, la inoculii de morcov, o asociere a fenomenului de *hiperhidrie* cu cel de *habituație*, respectiv cu *anergismul*, culturile de tip *habituat* fiind apte să-și sintetizeze *auxinele* și *citochininele* de care acestea au strictă nevoie, precum și unele vitamine, compuși care fitoinoculilor le sunt indispensabili atât în reglarea multiplicării și a creșterii celulare, cât și a morfogenezei.

Gaspar, împreună cu colaboratorii săi, a publicat o serie de lucrări axate pe problematica *hiperhidriei*, și a comparării acestor profunde modificări morfofiziologice și biochimice petrecute la nivelul fitoinoculilor, cu procesele caracteristice *habituației*, ca forme de *cancerizare* a celulelor vegetale aflate în regim de vitrocultură (*Franck* și colab., 1997; *Gaspar*, 1998; *Gaspar* și colab., 1998; *Bisbis* și colab., 1998; *Le Dily* și colab., 1998; *Vandemoortele* și colab., 1999; *Kevers* și colab., 1999).

Pâques (1991) a fost de părere că, chiar și la vitroculturile vegetale, procesul de *hiperhidrie* se caracterizează prin existența a două mecanisme

diferite de producere a acesteia. Astfel, el a apreciat că există o formă de *hiperhidrie* care *nu* presupune implicarea unor procese fiziologice, ci se caracterizează printr-o difuziune pasivă, fizică, a apei în spațiile intercelulare ale țesuturilor vegetale, vitrocultivate, și o instalare *activă* a acestui fenomen, în celulele și în structurile histologice ale fitoinoculilor, stare caracterizată printr-o declanșare pe căi biochimice a unor tulburări ale echilibrului de funcționare normală a acestora, mai ales în ceea ce privește desfășurarea metabolismului glucidic.

După cum se va putea vedea în prezentul capitol, există o multitudine de puncte de vedere referitoare la cauzele care produc *hiperhidria* la nivelul vitroculturilor vegetale. De exemplu, lăstarii devin *hiperhidrici* dacă părți din aceștia cresc în profunzimea mediului de cultură (mai ales în cel agarizat), sau dacă ei se află în contact direct cu suprafața acestuia (*Pâques* și *Boxus*, 1987b; *Lauzer* și *Vieth*, 1990; *Cachiță* și *Crăciun*, 1990; 2004).

Deberg și colaboratorii (1981) au fost de părere că, *hiperhidria* este provocată exclusiv de condițiile improprii existente în recipientele de cultură, care nu asigură fitoinoculilor o evoluție favorabilă a acestora, ea nefiind o consecință a factorilor ecofiziologici în care au fost crescute plantele mame, donatoare de explante.

Cauzele declanșării *hiperhidriei*, la organele plantelor crescute în natură sau *in vitro*, sunt încă în mică măsură cunoscute.

Dar, după *Gaspar* (1991), *in vitro hiperhidria* se produce doar la fitoinoculii crescuți pe medii de cultură destinate asigurării *multiplicării* acestora, și niciodată pe medii adecvate inducerii și a întreținerii proceselor de *rizogeneză*. Fitoinoculii supuși unei multiplicării intense, pe medii în care ei sunt frecvent subcultivați (inducând și susținând o capacitate ridicată de regenerare), sunt mai predispuși la apariția *hiperhidriei* (*John*, 1986; *Boxus* și *Pâques*, 1987).

Hiperhidria (*vitrificarea*), sau *hiperhidricitatea* țesuturilor fitoinoculilor, este un fenomen care este întâlnit destul de frecvent la unele tipuri de vitroculturi vegetale, mai ales la cele cultivate în *regim hidric* și *termic ridicat*, pe/ sau în medii – solide sau lichide – bogate în *citochinine*, ori crescute pe un substrat cu un conținut *scăzut de agar-agar*, sau în prezența unui nivel ridicat de *etilenă*, în atmosfera din recipientele de cultură, ș.a.m.d. Astfel de cauze sunt frecvent incriminate ca fiind responsabile de declanșarea fenomenelor de *vitrificare*, ele accelerând și amplificând procesele de *hiperhidrie* desfășurate pe plan celular și tisular.

În ultimele două decenii, studierea *hiperhidriei* – produse la nivelul fitoinoculilor – a fost mult intensificată. În momentul de față, astfel de

cercetări ocupă o poziție importantă în literatura de specialitate de profil, cu toate că *Gautheret*, încă în anul 1977 a semnalat și a descris acest fenomen.

Gradele de intensitate ale *hiperhidriei*, în ceea ce privește exteriorizarea aspectelor morfologice, specifice, sunt manifeste – în primul rând – prin schimbări produse în *caracterele fenotipice* ale fitoinoculilor, în marea lor majoritate simptomele de anormalitate descrise fiind *nereversibile*, factorul *genetic* acționând de manieră decisivă în amploarea distrucțiilor și a malformațiilor provocate biostructurilor vegetale de către condițiile ambientale în care evoluează fitoinoculii (*George*, 1996).

În general, comparativ cu lăstarii normali, vitrotulpinițele cu simptome slabe de *hiperhidrie* manifestă o creștere mult mai rapidă, ele prezentând o rată mai ridicată de regenerare de mugurași axilari; însă, dacă condițiile de cultură se dezechilibrează prea mult, unele dintre aceste avantaje pot să se piardă (*George*, 1996).

2.2. PRINCIPALELE ASPECTE CARE CARACTERIZEAZĂ STAREA DE *HIPERHIDRIE* LA FITOINOCULI. POTENȚIALII FACTORI RESPONSABILI DE PRODUCEREA ACESTUI FENOMEN

2.2.1. PARTICULARITĂȚI MORFOANATOMICE, CITOLOGICE, ULTRASTRUCTURALE, FIZIOLOGICE ȘI BIOCHIMICE ÎNTÂLNITE LA FITOINOCULII *HIPERHIDRICI*

La plante, în cazul *hiperhidriei* care se manifestă în condiții aseptice, transparentizarea țesuturilor se petrece într-un interval de timp variabil ca durată, în funcție de condițiile ecologice existente în recipientele de cultură, de calitățile genetice ale fitoinoculilor, de tipul vitroculturilor, de faza de creștere și de morfogeneză în care se găsește materialul vegetal vitrocultivat etc.

În general, vitroplantulele afectate puternic de *hiperhidrie* au *tulpinițele* (respectiv lăstărașii) mai scunde (fig. 27A), cu internodii mai scurte și, adeseori, mai îngroșate decât cele ale organelor similare regenerate la nivelul fitoinoculilor *nehiperhidrici*.

La vitrotulpinițele *hiperhidrice*, fenomenul de dominanță apicală – exercitat de către meristemul caulinar, terminal – este diminuat, ceea ce determină o sporire a capacității fitoinoculilor de a regenera, la nivelul acestora, nenumărați mugurași (fig. 28B și fig 29D; fig. 30B-E) și lăstărași, mărindu-se astfel randamentul în micropropagare. De exemplu, la vitroculturile *hiperhidrice* de *Picea abies*, *Bornman* și *Vogelman* (1984) au reușit să obțină, per un inocul, un randament de multiplicare de zece ori mai mare

în regenerarea de mugurași și de lăstărași, față de situația observată la vitroculturile similare, normale, neafectate de acest fenomen.

Fig. 27. Vitroplantule de *Coleus blumei* Benth., în vârstă de 9 săptămâni (M – plantule normale; H – plantule *hiperhidrice*), (*Radoveț*, 2007).

Tot cam în aceeași perioadă, *Aitken* și colaboratorii (1981; 1985), la culturile *hiperhidrice* de *Pinus radiata* au obținut o proliferare mult mai intensă a mugurașilor, decât la fitoinoculii similari neafectați de acest sindrom, dar procentul de supraviețuire al exvitroplantulelor regenerate din plantulele *vitrificate* a fost foarte scăzut. După *John* și *Pearson* (1985) și *John* (1986) și *Gaspar* (1991), *hiperhidria* poate fi valorificată în mărirea ratei de multiplicare *in vitro*, în special a coniferelor, de exemplu a plantelor de *Sitka spince*. Dar, la rezultate similare au ajuns și *Leshem* și *Sachs* (1985), experimentând cu vitroinoculi de garoafe.

Pentru ca *hiperhidria* să poată fi valorificată în tehnicile de micropropagare, ca o cale de sporire a randamentelor în procedurile de multiplicare, trebuie descoperite metode de anihilare a fenomenelor nedorite, manifeste la vitroplantulele *vitrificate*, astfel încât să se reușească aclimatizarea cu succes a exvitroplantulelor, în momentul transferării lor în mediul septic.

Pe lângă cele arătate precizăm că, *frunzulițele* vitroplantulelor *hiperhidrice* prezintă diferite grade de malformare, având un aspect degenerat, frecvent acestea fiind hipertrofiate, cu limbul tumefiat (fig. 28C și D), uneori recurbat, rugos, ondulat, de culoare verde pală, în final cu manifestări de senescență, sau chiar de necroză (fig. 28D), transformări care se petrec gradat, pe parcursul a mai multor săptămâni de vitrocultură.

Organele fitoinoculilor marcate de *hiperhidrie* nu numai că dobândesc unui aspect „*sticlos*", țesuturile lor devenind *vitroase* sau *translucide*

BOTANICAL GARDEN UNIVERSITY LIBRARY

din cauza inundării interstițiilor acestora cu apă (fapt demonstrat încă de către *Pâques* şi *Boxus*, în anul 1985, prin efectuarea de determinări ale conținutului în apă, în frunzele normale şi în cele *hiperhidrice*), ci celulele lor, în timp, suferă profunde modificări structurale şi dezorganizări ultrastructurale.

Fig. 28. Vitroculturi de sfeclă de zahăr (*Beta vulgaris* var. saccharifera) (A – propagul normal; B – propagul *hiperhidric* cu un accentuat proces de multiplicare; C şi D – propaguli de sfeclă aflați într-un stadiu avansat de *hiperhidrie* şi de hipertrofie foliară, unele frunzulițe prezentând zone necrozate).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 29. Vitroplantule de garoafe (*Dianthus caryophyllus* L.) regenerate din variate tipuri de explante (A – vitroplantule normale, derivate din apexuri caulinare inoculate şi crescute pe mediu cu amestec de AIB şi BA, câte 1 mg/l; B şi C – lăstari *hiperhidrici* regeneraţi din pedunculul floral al bobocilor cultivaţi pe mediu cu KIN 1 mg/l sau pe amestec de ANA şi KIN, câte 1mg/l; D – regenerarea de nenumăraţi mugurași şi de lăstărași *hiperhidrici* din inoculi tip minibutaşi apicali, crescuţi pe mediu cu adaos de BA 2,5mg/l).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

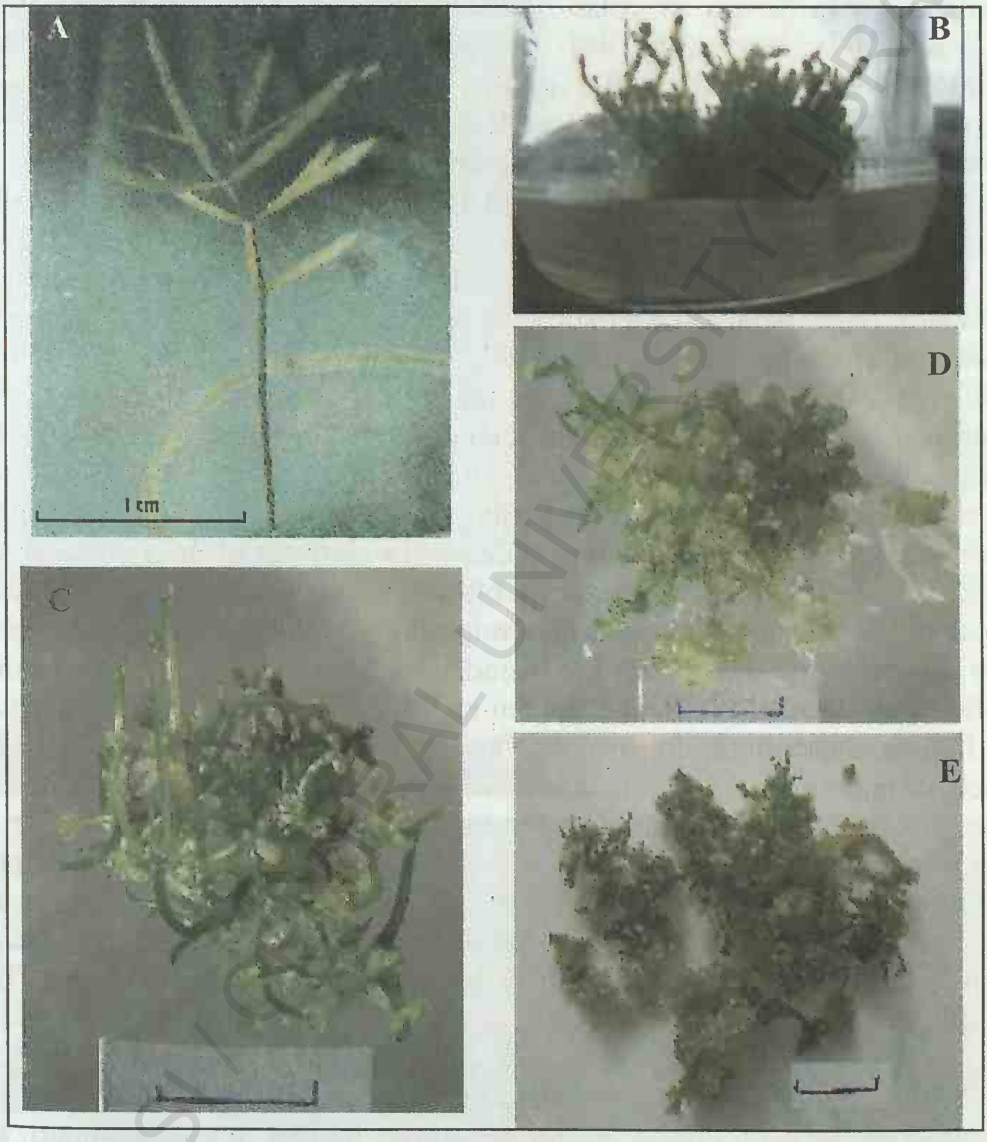


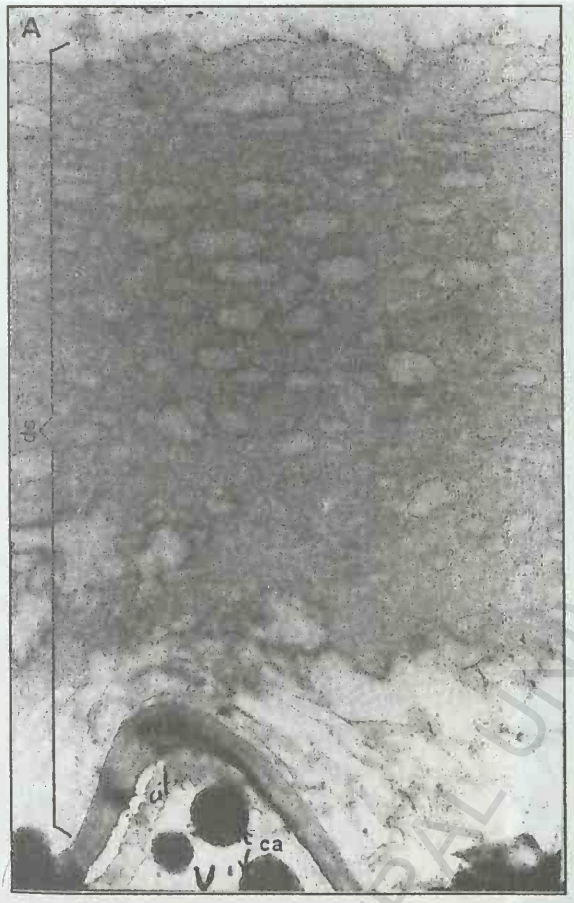
Fig. 30. Aspectul vitroculturilor de sparanghel (*Asparagus officinalis* L.); A – imaginea unei plantule normale de sparanghel, generată „*in vitro*" din embrionul seminței germinate în regim aseptic; B-E – regenerarea de lăstari *hiperhidrici* din calus *vitrificat* și friabil de sparanghel (*Cachiță* și *Hurgoiu*).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Celulele organelor afectate de *hiperhidrie* sunt hipertrofiate, malformate, uneori pereții acestora sunt subțiri, hipolignificați și fragili (*Bader* și colab., 1981; *Kevers* și colab., 1984; *Kevers* și *Gaspar*, 1985b; 1986; *Gaspar*, 1991; 1995; *Ziv*, 1991; *George*, 1996; *Cachiță* și *Crăciun*, 1990; 2004; *Cachiță* și colab., 1991, și alții); alteori, în situația afundării frunzulițelor – de exemplu la vitroplantulele de *Forsythia* (fig. 31A și B) – în mediul de cultură agarizat, peretele extern al epidermei suferă un proces de îngroșare puternică, depozitul având o structură spongioasă, este friabil, respectiv casant.

De regulă, tulpinițele sau limburile frunzulițelor *hiperhidrice* au o culoare verde pală, caracteristică aspectului de *vitrozitate*, mai rar tenta acestora fiind închisă (*Navalet*, 1982; *Borkowska* și *Michalczuk*, 1987; *Boxus* și *Pâques*, 1987). Lăstarii de sparanghel, neoformați la nivelul calusurilor *hiperhidrice*, au fost translucizi și au avut o culoare verde deschisă (fig. 30B-E) (*Cachiță* și *Hurgoiu* – lucrare sub tipar). Un caz particular constatat de noi a fost observat la nivelul neoformațiunilor caulinare regenerate pe suprafața explantelor prelevate din vitrocactuși de *Aylostera heliosa* (*Cachiță* și *Vidican* – date nepublicate), ce au constat din rondele obținute prin secționarea transversală a tulpinilor sferoidale ale acestora, având un diametru de cca. 10 mm. Rondelele au fost cultivate pe mediul *Murashige-Skoog* (1962), agarizat, cu aport de 1 mg/l AIB (fig. 32A). După 3 luni de vitrocultură, din rondele s-au regenerat câte 4-5 minitulpinițe sferice, de aproximativ 5 mm în diametru. La varianta cu 1 mg/l BA în mediul de cultură (fig. 32B), tulpinițele sferoidale neoformate din inoculul inițial s-au hipertrofiat, au devenit *hiperhidrice*, depigmentate, lipsite de spini prezentând calus vitrificat în zona lor bazală; același tip de explante, cultivate pe un mediu de bază identic, dar cu aport de 1 mg/l AIB și 1 mg/l BA, nu au dat naștere la formațiuni caulinare, ci au generat doar *calus hiperhidric* (fig. 32B și C).

La vitroplantulele *hiperhidrice* de *Coleus*, după cum rezultă din figura 27H, frunzulițele au fost considerabil depigmentate (*Radoveț*, 2007), fitoinoculii de acest tip prezentând un deficit de clorofilă în clorenchimuri, aspecte semnalate și de către *Jones* (1976) și de *Werner* și *Boe* (1980), la alte tipuri de fitoinoculi. Acest fapt, în cazul vitroculturilor nu înseamnă, întotdeauna (după *Leshem*, 1983b; *Crèvecouer* și colab., 1987; *Perry* și colab., 1999; *Fontes* și colab., 1999; *Chakrabarty* și colab., 2006) și o scădere substanțială a intensității și a randamentului fotosintezei, cu toate că la astfel de plantule, în general, capacitatea fotosintetică a fost foarte coborâtă.



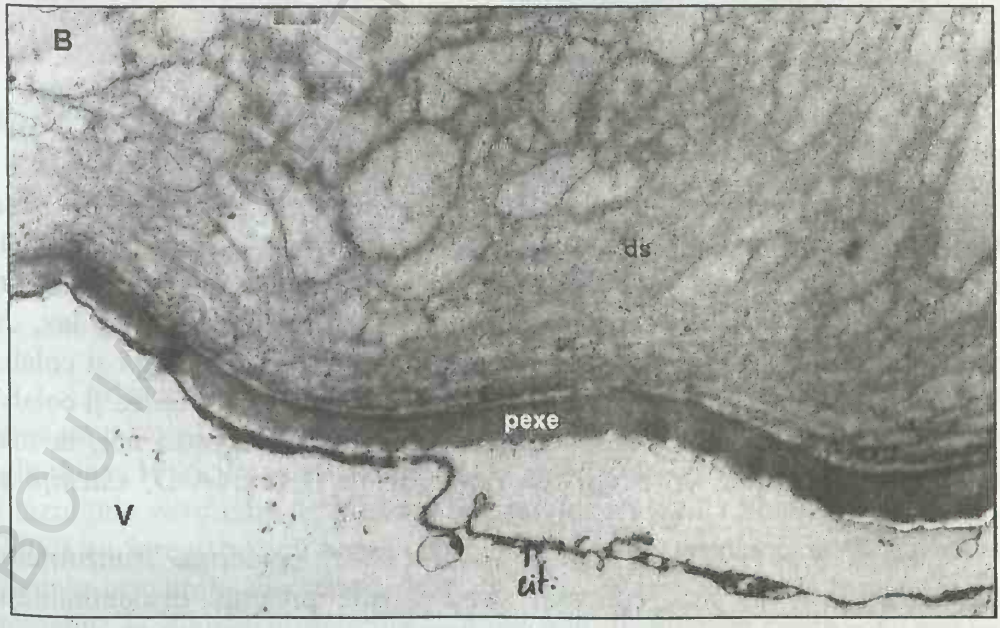


Fig. 31. Secțiune transversală prin depozitele spongioase, incolore și casante, prezente la nivelul suprafeței epidermei vitrofrunzulițelor *hiperhidrice* ale plantulelor de *Forsythia* sp. regenerate și crescute din minibutași apicali, inoculați pe mediu agarizat, cu aport de 0,1 mg/l AIA plus 1 mg/l BA (12.000x) (unde: ds – depozit spongios; pexe – perete extern al celulei epidermale; ca – corpusculi cu antociani; cit – citoplasmă; V – vacuolă).

BCU VASILE GOLDIȘ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

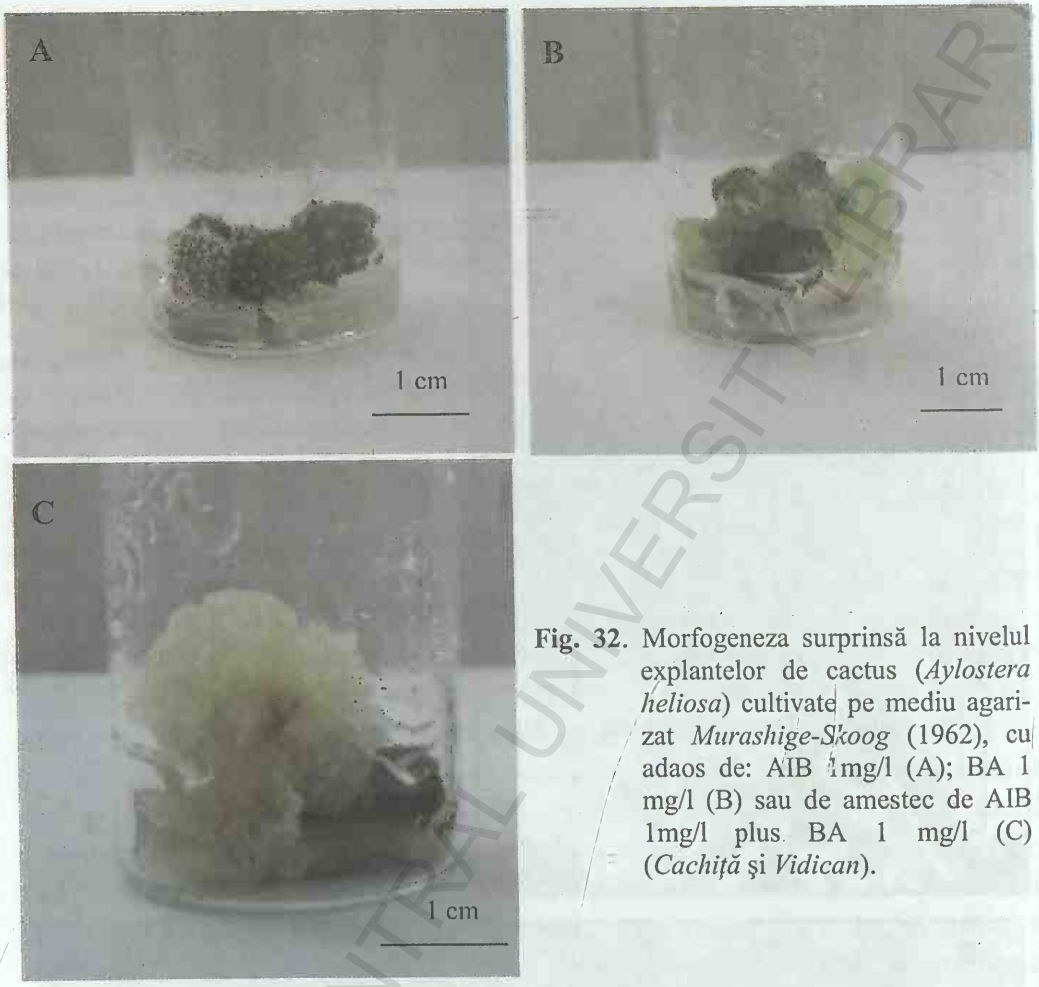


Fig. 32. Morfogeneza surprinsă la nivelul explantelor de cactus (*Aylostera heliosa*) cultivate pe mediu agarizat *Murashige-Skoog* (1962), cu adaos de: AIB 1mg/l (A); BA 1 mg/l (B) sau de amestec de AIB 1mg/l plus BA 1 mg/l (C) (*Cachiță* și *Vidican*).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În vitrofrunzulițele *hiperhidrice*, *Brainerd* și colaboratorii (1981) au identificat faptul că, în mezofilul *foliar* (abundent ca masă tisulară) diferențierea celulelor acestuia în parenchim palisadic a fost slabă (uneori chiar a lipsit), în limburi predominând un mezofil lacunos, de tip lax, cu spații intercelulare foarte mari (*Brainerd* și colab., 1981; *Debergh* și colab., 1981; *Vieth* și colab., 1983; *Von Arnold* și *Ericksson*, 1984; *Vieitez* și colab., 1987; *Franck* și colab., 1998), fenomen observat și de către noi, la mai multe specii vegetale, vitrocultivate (fig. 33C și D și 34A-D, *Cachiță* și colab., 2008).

După *Ziv* (1991) și *Ziv* și *Ariel* (1992) epiderma frunzulițelor *hiperhidrice* are un strat cuticular subțire, care prezintă discontinuități; totodată, la frunzulițele *hiperhidrice* ceara epicuticulară poate lipsi cu

desavârşire, sau dacă aceasta este prezentă ea este foarte subţire (*Grout* şi *Aston*, 1978; *Sutter* şi *Langhans*, 1979; *Ziv* şi colab., 1983; *Sutter*, 1985; *Aitken – Christie* şi colab., 1985; John, 1986; *Dhawan* şi *Bhojwani*, 1987; *Olmos* şi *Hellin*, 1998; *Ziv*, 1991; *Paek* şi *Hahn*, 2000).

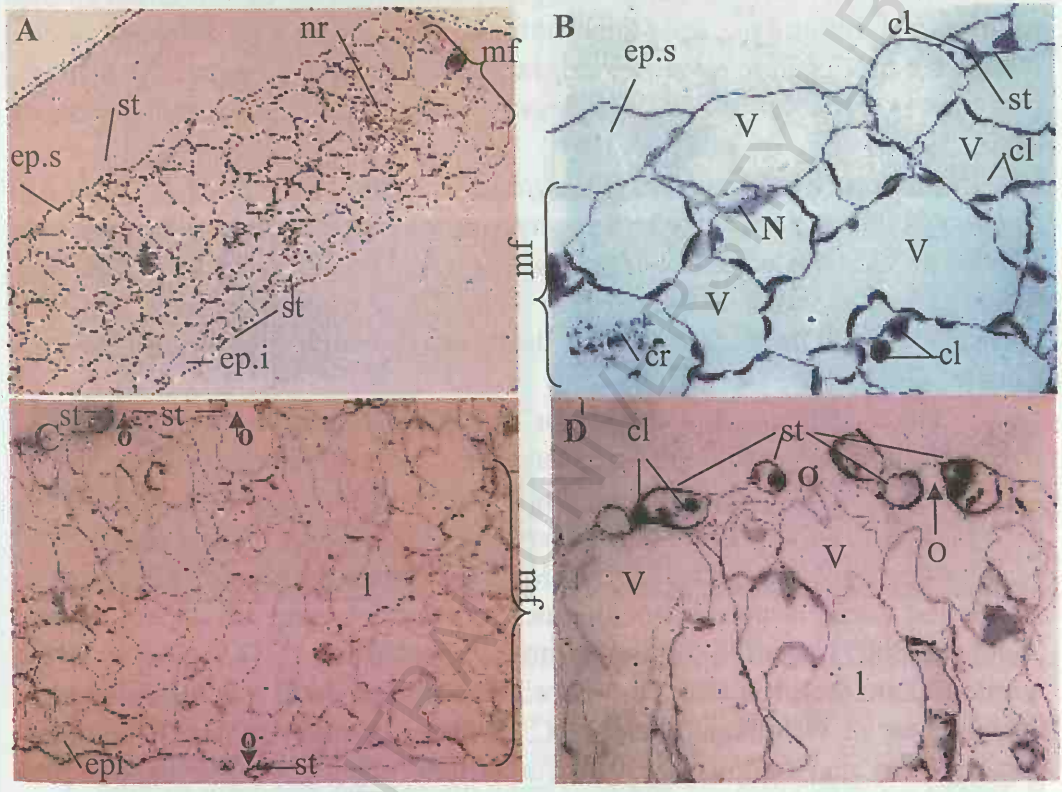


Fig. 33. Imagini de microscopie optică, vizualizate la nivelul secţiunilor transversale practicate prin vitrofrunzuliţele plantulelor de sfeclă de zahăr (*Beta vulgaris* var. saccharifera) (A – plantule normale: 20x; B-D – plantule *hiperhidrice*: unde – B-900x; C-240x; D-600x; cl – cloroplaste; cr – cristale de oxalat de calciu; eps – epidermă superioară; epi – epidermă inferioară; l – lacună aeriferă; st – stomată: nr – nervură; mf – mezofil foliar; N – nucleu; O – osteolă; V – vacuolă) (*Cachiţă* şi colab., 2008c)

Adeseori, în epiderma frunzuliţelor *hiperhidrice* s-a semnalat prezenţa unui număr redus de stomate (*Brainerd* şi colab., 1981; *Leshem*, 1983 a, b; *John*, 1986; *Pasqualetto*, 1988; *Olmos* şi *Hellin*, 1998). Dimpotrivă, la frunzuliţele *vitrificate* de *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn, *Paek* şi *Hahn* (2000) au înregistrat un număr mai mare de stomate, decât acela marcat la plantele provenite din natură; dar, în ceea ce priveşte lungimea celulelor stomatice şi diametrul acestora – după autorii anterior citaţi – nu au fost

observate diferențe semnificative între cele două tipuri de vitrofrunzulițe. Pe de altă parte, *Brainerd* și *Fuchigami* (1982), *Dhawan* și *Bhojwani* (1987) și *Ziv* și colaboratorii (1987), în urma experimentelor efectuate de către ei, aceștia au ajuns la concluzia potrivit căreia atât la tulpinițele, cât și la frunzulițele *hiperhidrice* mecanismul de închidere și de deschidere a stomatelor a fost ineficient, sau chiar nefuncțional, la nivelul vitroplantulelor respective producându-se o pierdere rapidă, necontrolată, a apei din țesuturi, mai ales în decursul aclimatizării exvitroplantulelor la un regim scăzut de umiditate.

Din cercetările noastre (*Cachiță* și *Crăciun*, 1990; 2004 și *Cachiță* și *Petruș*, 2008) a rezultat că, frecvent, stomatele vitrofrunzulițelor *hiperhidrice* au avut fie osteolele larg deschise (fig. 33C-D și 35A), fie celulele lor au fost implozate (fig.34A și B și 35B), fie una dintre celulele stomatice a fost atrofiată; în toate situațiile descrise, stomatele au devenit nefuncționale.

După *Miguens* și colaboratorii (1993), stomatele vitrofrunzulițelor *vitrificate* prezintă celule anexe deformate, fenomen observat ulterior, și de către noi (*Cachiță* și colab., 2008) (fig. 33D și fig. 34A și B) La cele arătate, menționăm că, la vitroplantulele *hiperhidrice* de *Coleus blumei* Benth și de *C. hybridus* Jupiter numărul stomatelor a fost mai scăzut la vitrofrunzulițele *vitrificate*, decât la cele vitrocultivate, dar care au avut un aspect normal (*Radoveț* 2007). Astfel, la frunzulițele *hiperhidrice* de *C. blumei* Benth numărul stomatelor a fost de 4 ori mai redus decât la vitroplantulele normale, iar la vitrofrunzulițele de *C. hybridus* Jupiter numărul acestora a fost de 6 ori mai scăzut, decât la frunzulițele plantulelor martor, *nehiperhidrice*. În plus, 10% dintre stomatele vitrofrunzulițelor *hiperhidrice* au avut un aspect mumificat, ele fiind implozate, iar cele menținute deschise au avut diametrul osteolelor de 5 ori mai mare, decât cel al celor prezente la nivelul epidermei vitrofrunzulițelor normale. Un alt aspect relevat de *Radoveț*, a fost acela că, la ambele specii de *Coleus* luate în studiu, vitroplantulele *hiperhidrice* au deținut frunzulițele care nu au prezentat pe epiderma lor nici perișori tectori și nici glandulari, cu toate că frunzele plantelor cultivate în mediu natural, sau în sere, sunt pubescente, fiind acoperite cu peri pe ambele fețe ale limbului foliar.

În ceea ce privește transformările intervenite la nivelul celulelor *clorenchimurilor hiperhidrice*, *Rugini* și colaboratorii (1985) afirmau că frunzele *vitrescente*, pe lângă că nu au prezentat ceară epicuticulară, cloroplastele mezofilului lor foliar au avut granele slab reprezentate.

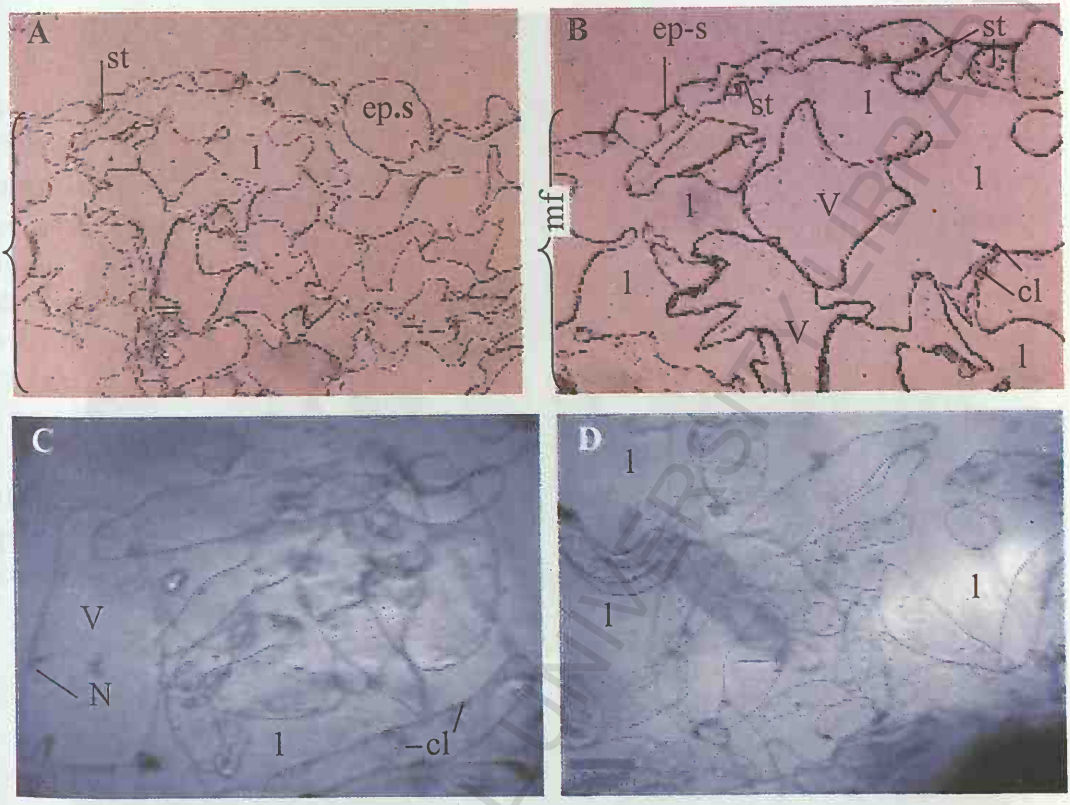


Fig. 34. Secțiuni transversale practicate prin mezofilele foliare ale vitrofrunzulițelor *hiperhidrice*; A și B de sfeclă de zahăr (*Beta vulgaris* var. saccharifera) (A și B, imagini văzute la microscopul optic unde: A – 60x; B – 90x; C și D, de garoafe (*Dianthus caryophyllus* L.) imagini surprinse la microscopul confocal abrevieri: (ep.s – epidemă superioară; mf – mezofil foliar; l – lacună; cl – cloroplaste; V – vacuolă; st – stomată) (*Cachiță* și colab., 2008b).

În cadrul a o serie de experimente efectuate de către *Cachiță* (1987) și de *Cachiță* și *Crăciun* (1990; 1997 și 2004), *Cachiță* și colaboratorii (2008a și b), în scopul analizării modificărilor intervenite pe plan ultrastructural, în celulele frunzulițelor *hiperhidrice* (vezi fig. 34, 35; 37, 40), sau în cel al calusurilor de acest tip (fig. 39), s-au urmărit atât aspectele generale care reflectă alterările provocate celulelor *vitrificate* de procesele de *hiperhidrie*, cât – mai ales – cele petrecute în structura cloropastelor, la nivelul acestora constatându-se prezența unor transformări profunde, în funcție de specie, de țesutul analizat, de tipul fitoinoculului și de condițiile de cultură.

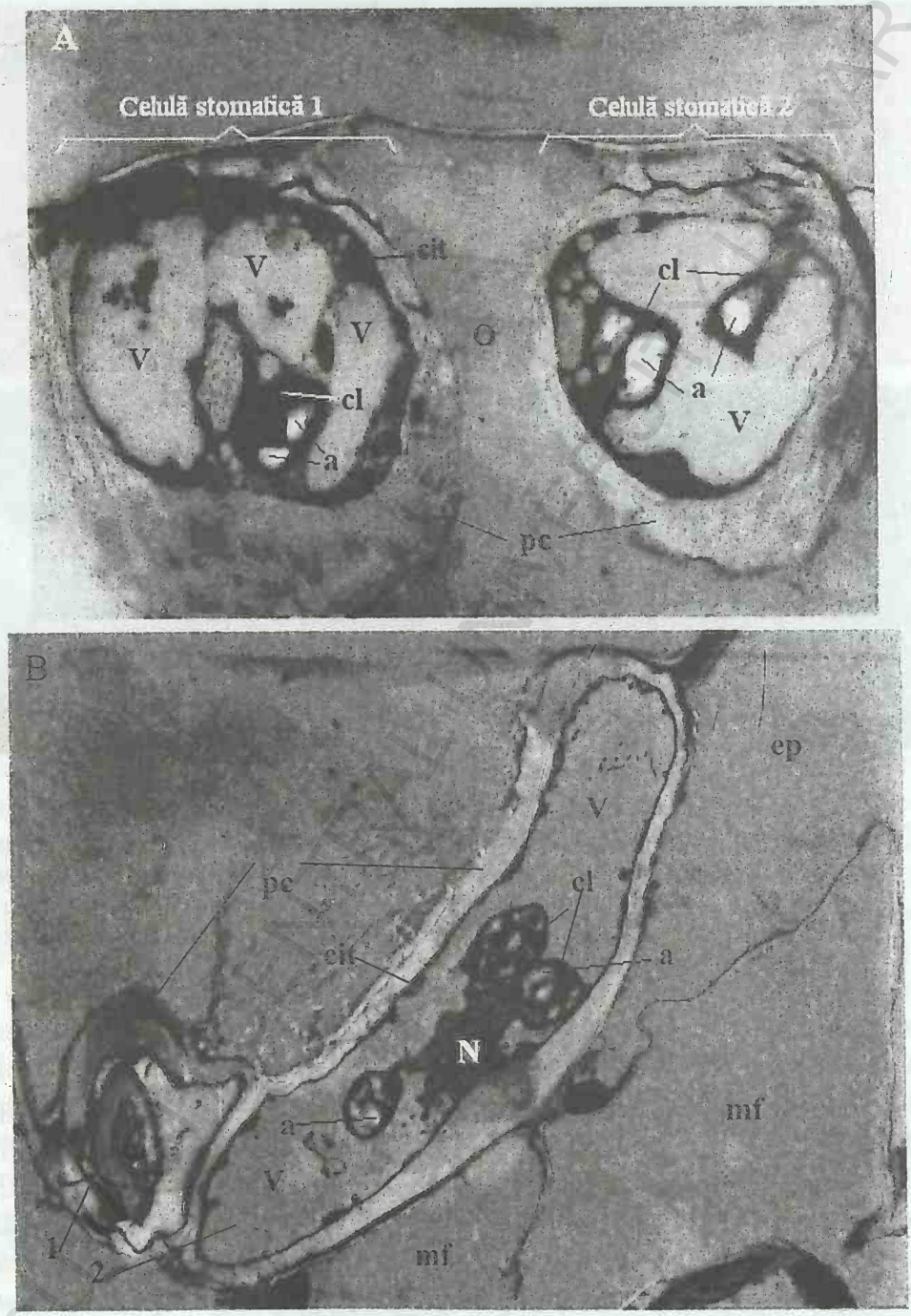


Fig. 35. Stomate prezente în epiderma vitrofrunzulițelor *hiperhidrice* de garoafe (*Dianthus caryophyllus* L.), văzute la microscopul electronic cu transmisie (A – secțiune transversală printr-o stomată deschisă; B – secțiune longitudinală printr-o stomată închisă, având una dintre celule atrofiată – 1 și cea de a doua – 2 - normală) (12.000 X) (abrevieri: a – amidon; pc – perete celular; cl – cloroplast; cit – citoplasmă; ep – celulă epidermală; O – osteolă; mf – mezofil foliar; N – nucleu; V – vacuolă).

În figura 36 (A şi B) sunt ilustrate aspectele electronomicroscopice surprinse în parenchimul asimilator al vitrofrunzulițelor de garoafe (*Dianthus caryophyllus* L.), *nehiperhidrice*. Față de aspectul întâlnit în celulele normale, la vitroplantulele care au suferit transformări *vitrificante* (de comparat fig. 36A şi B, cu fig. 37A-E), cloroplastele din celulele mezofilului foliar au prezentat dezorganizări structurale, granele lor fiind într-un proces de dezmembrare. În plus, la vitroplantulele *vitrificate* stroma cloroplastelor vitrofrunzulițelor a suferit un fenomen de vacuolizare (fig. 37B,D şi E), care treptat, în final, a condus chiar la o clivare a unora dintre aceste cloroplaste (fig. 38), aspecte descrise de către *Cachiță* încă în anul 1987, ulterior detaliate şi în primul volum al prezentului tratat (la pag. 207). Acest proces, de dezorganizare a ultrastructurii cloroplastelor ar putea explica – odată în plus – pierderea capacității de supraviețuire a exvitroplantulelor *hiperhidrice*, în momentul aclimatizării lor la viața în mediul septic.

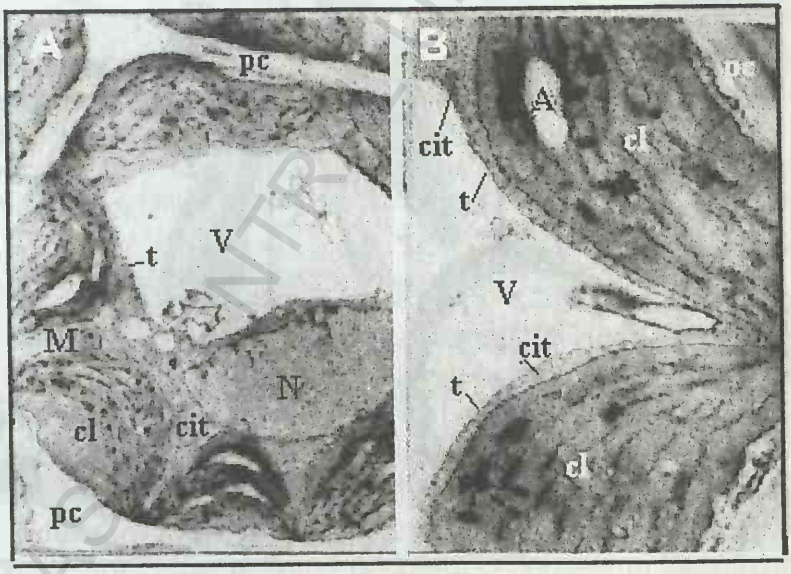


Fig. 36. Aspecte observate la microscopul electronic cu transmisie, în *frunzulițele* vitroplantulelor normale de garoafă (*Dianthus caryophyllus* L.) (A – 6800x; B – 12000x; unde: cl – cloroplaste; A – amidon; cit – citoplasmă; N – nucleu; M – mitocondrii; pc – perete celular; t – tonoplast; V – vacuolă) (*Cachiță* şi *Crăciun*, 2004).

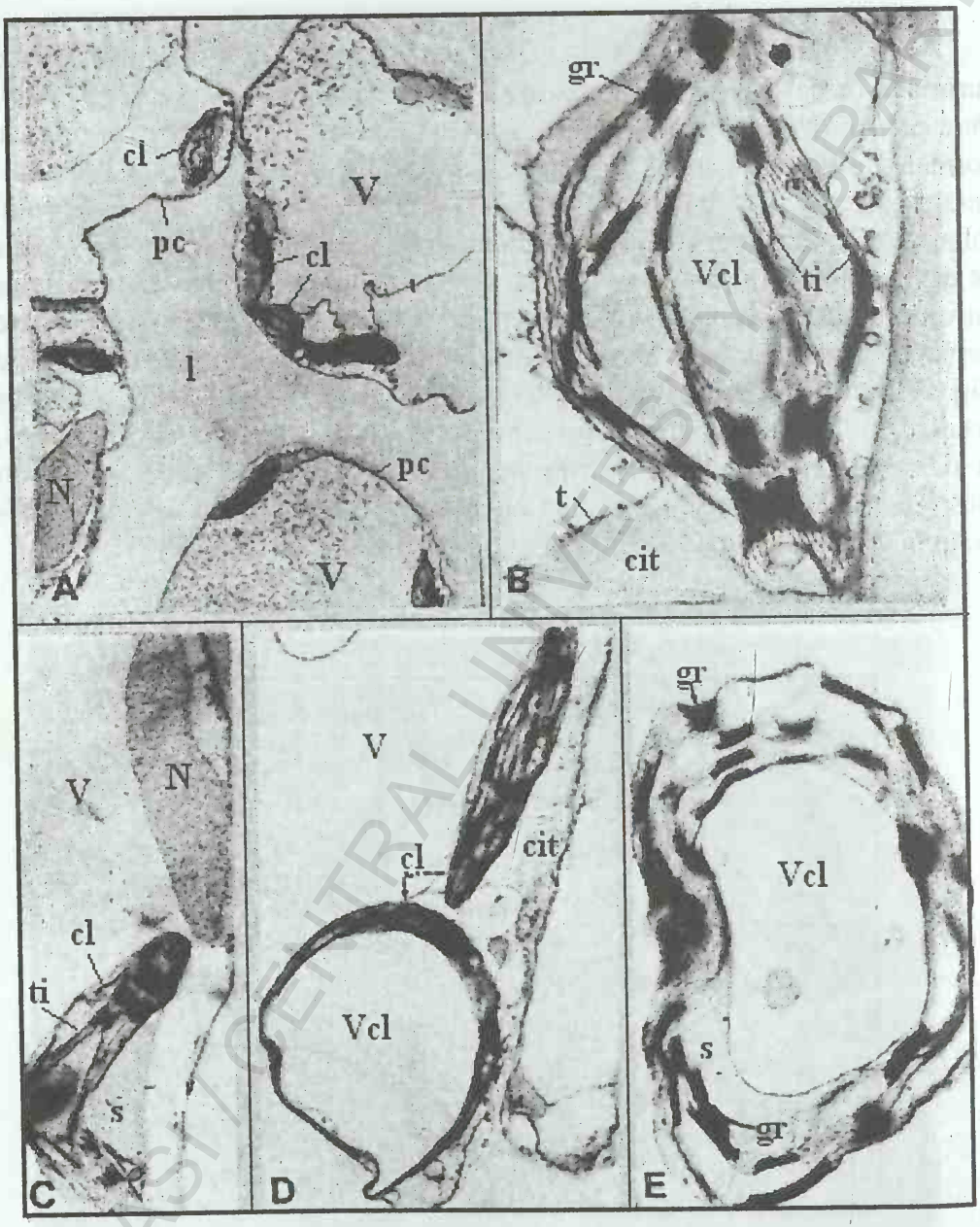


Fig. 37. Aspecte electronomicroscopice (microscopie electronică cu transmisie) surprinse în *mezofil foliar* al vitroplantulelor *hiperhidrice* de garoafe (*Dianthus caryophyllus* L.) (A – imagine de ansamblu; B-E – detalii de alterare a ultrastructurii cloroplastelor) (A – 3800x; B – 30.000x; C – 8000x; D . 6500x; E – 15.000x; unde: cit – citoplasmă; cl – cloroplaste; gr – grane; s – stromă; Vcl – vacuolizare stromă cloroplast; pc – perete celular; t – tonoplast; ti – tilacoide) (*Cachiță și Crăciun*, 1990).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

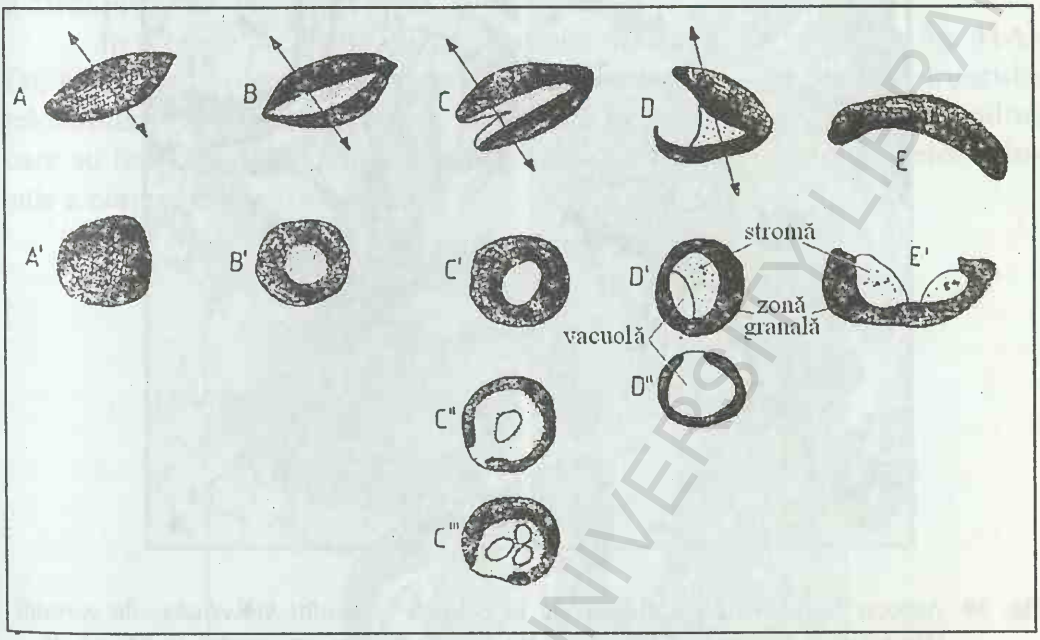


Fig. 38. Schemă care ilustrează fazele posibil de întâlnit în dezorganizarea cloroplastelor, în *frunzele vitrificate* ale vitroplantulelor *hiperhidrice* de garoafe (*Dianthus caryophyllus* L.) A-E – secțiuni longitudinale prin cloroplaste aflate în faza de clivare; A'-E' – secțiune transversală prin cloroplaste; C"-C'" și D".– alte faze posibil de observat în procesul de vacuolizare al cloroplastelor) (*Cachiță*, 1987).

În cazul *calusului hiperhidric* de garoafe (fig. 39A și B), noi am remarcat (*Cachiță* și *Crăciun*, 2004) producerea unor alterări profunde ale structurilor celulare, nu numai la nivelul cloroplastelor – ce dețin masive depuneri de amidon în stroma plastidelor (fig. 39B) – ci și a nucleilor acestor celule, uneori ei devenind de tip ameboidali (fig. 39A); tonoplastul celulelor calusului *hiperhidric* poate fi întrerupt, pe alocuri, iar sucul vacuolar al acestor celule prezintă floculații și corpusculi sferoidali, puternic electrodenși (probabil de natură fosfolipidică), ce se depun pe tonoplast; uneori, în citoplasma celulelor *hiperhidrice* s-a remarcat prezența unor depuneri lipidice, masive (fig. 39B).

BCU "ION CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

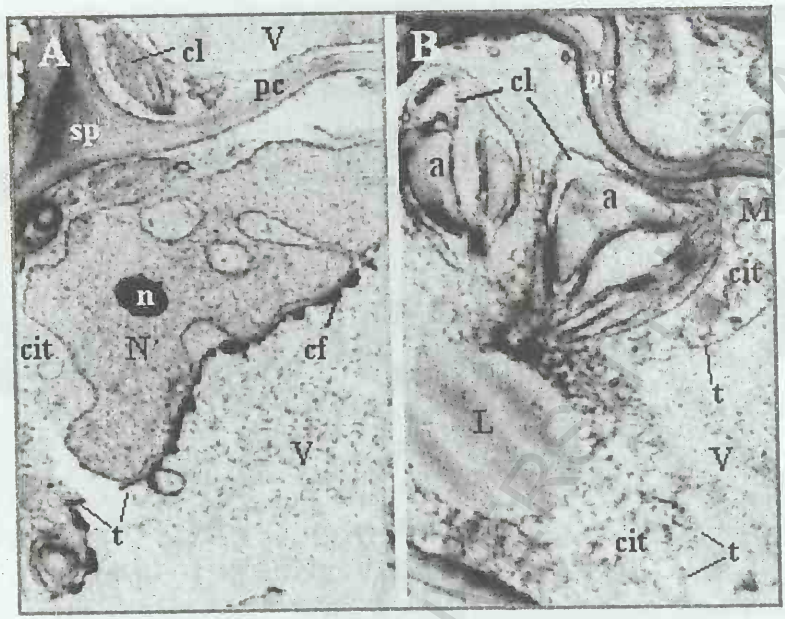


Fig. 39. Aspecte ultrastructurale vizualizate în celulele *calusului hiperhidric* de *garoafă* (*Dianthus caryophyllus* L.). A – Nucleu cu contur ameboidal (8200 x); B – citoplasmă cu picături lipidice și cloroplaste cu depuneri de amidon, (6800x); unde: a – amidon; cit – citoplasmă; cf – corpusculi fosfolipidici; cl – cloroplast; L – lipid; M – mitocondrie; N – nucleu; n – nucleol; pc – perete celular; t – tonoplast; V – vacuolă) (*Cachiță* și *Crăciun*, 2004).

La vitroculturile de crizanteme (*Chrysanthemum morifolium* Ram.), inoculii constând din explante foliare, prelevate din apexurile limburilor, precum și calusul regenerat la nivelul acestora, la contactul cu mediul de cultură, agarizat, au generat țesuturi *hiperhidrice*; în celule parenchimatoase ale acestora (fig. 40 și 41), în plan ultrastructural au putut fi identificate modificări citologice, într-o oarecare măsură diferite de cele descrise la garoafe. Astfel, comparativ cu celulele mezofilului foliar al vitrofrunzulițelor normale de crizanteme (fig. 40A), la fitoinoculii similari, hipertrofiați și *vitrificați*, dezorganizarea cloroplastelor a fost mai puțin importantă (fig. 40B-D), dar, s-a remarcat că în astfel de celule, cloroplastele au fost mai mici și mai aplatizate.

În celulele mezofilului foliar al vitrofrunzulițelor *hiperhidrice* de crizanteme s-au observat frecvente dezmembrări ale citoplasmei și ale tonoplastului acesteia (fig. 40B și C); nucleii, în astfel de celule, au prezentat deformări și aspect picnotic, iar mitocondriile au fost mărite; în sucul vacuolar al acestor celule s-au putut distinge corpusculi sferici, puternic electrondenși, probabil de natură fosfolipidică (cristale lichide sau lipo-

zomi). La alterările descrise se adaugă și existența în celule a peroxizomilor, a căror prezență a fost frecventă.

În probele prelevate din *calusul hiperhidric* de crizanteme (fig. 41A-D), la alterările ultrastructurale menționate în limbul foliar al vitrofrunzulițelor suferinde de acest sindrom, se adaugă frecvența mare a peroxizomilor, care au fost de dimensiuni crescute, și absența din vacuolele celulelor calusale a corpusculilor fosfolipidici.

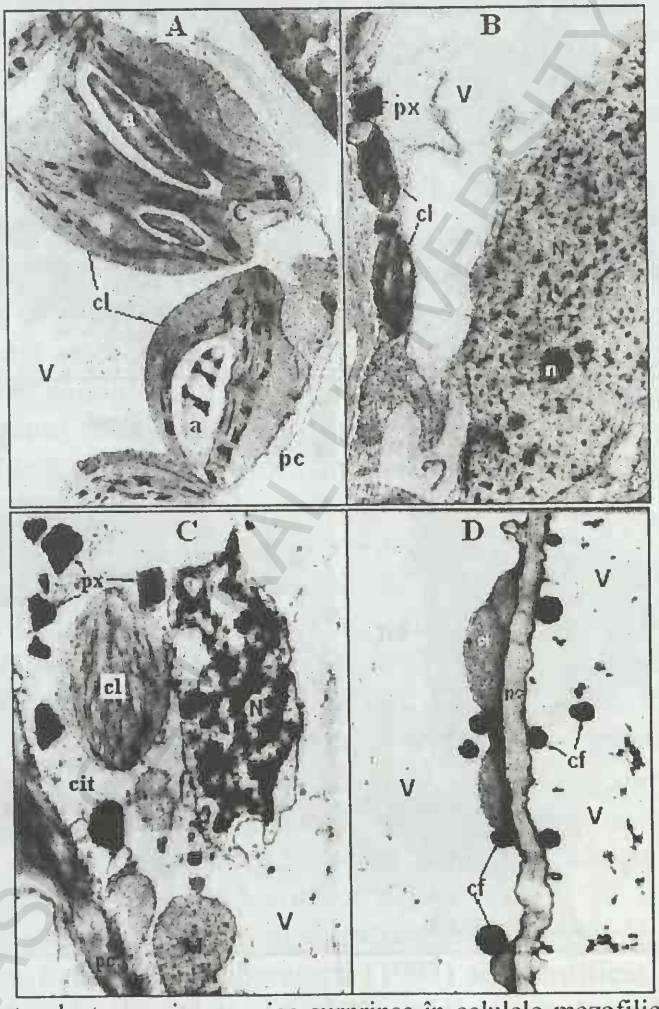


Fig. 40. Aspecte electronomicroscopice surprinse în celulele mezofiliene ale *frunzulițelor* vitroplantulelor normale de crizanteme (*Chrysanthe-mum morifolium* Ram.) (pozițiile A și B) și în cele *hiperhidrice* (pozițiile C și D) (A – 8000x; B – 6000x; C – 6800x; D – 6000x; unde: a – amidon; cl – cloroplast; cit – citoplasmă; cf – corpusculi fosfolipidici; M – mitocondrie; N – nucleu; n – nucleol; px – peroxizomi; pc – perete celular; V – vacuolă) (*Cachiță* și *Crăcium*, 1990).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

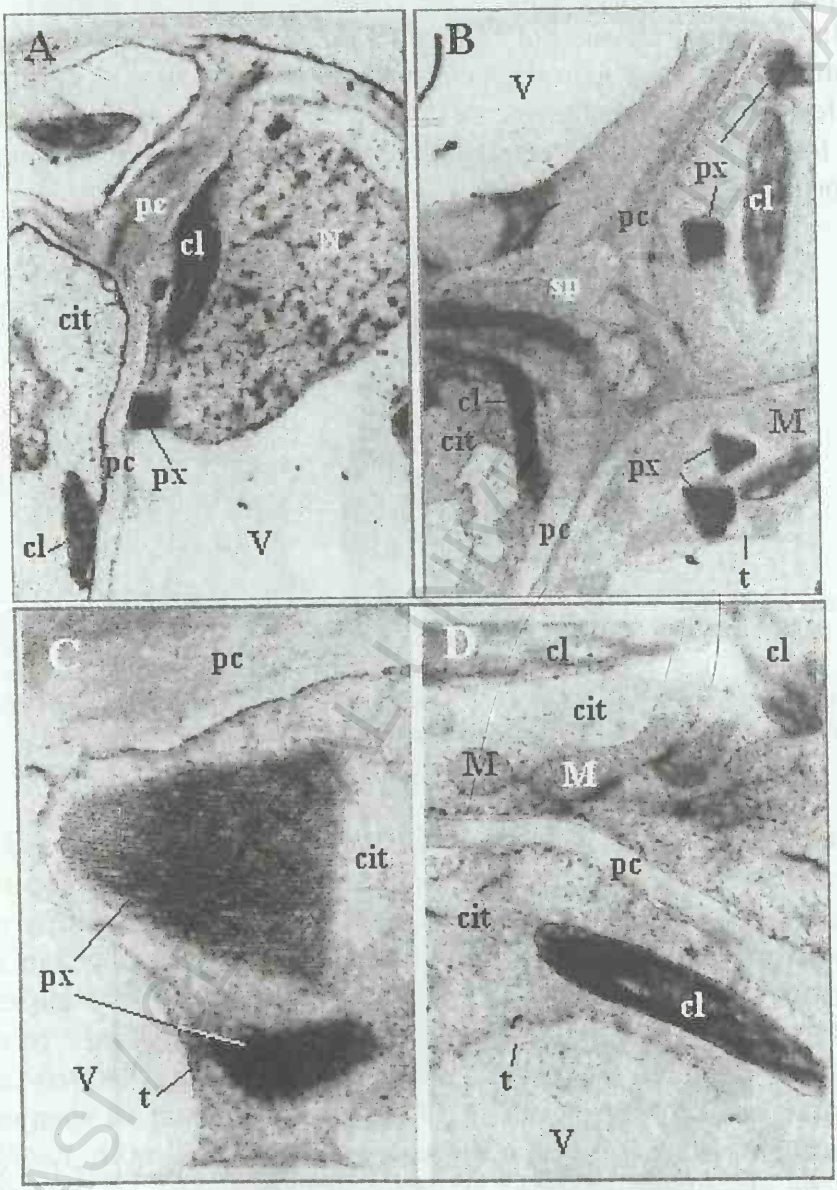


Fig. 41. Aspecte ultrastructurale în celule *calusale* de crizanteme (*Crysanthemum morifollium* Ram); A – calus normal (9100 x); B, C și D – calus *hiperhidric* (9100 x); C – peroxizomi, detaliu (47.000 x) (unde: cit – citoplasmă; cl – cloroplaste; N – nucleu; M – mitocondrie; pc – perete celular; px – peroxizomi; sp – spațiu intercelular; t – tonoplast; V – vacuolă) (*Cachiță* și *Crăciun*, 2004).

BCUIASI

În urma cultivării *in vitro* a o serie de inoculi de *Forsythia* sp., atât la nivelul *frunzulițelor* vitroplantulelor *hiperhidrice* crescute cu limbul afundat în masa mediului agarizat, cât şi la *calusul vitrificat*, în imaginile electronomicroscopice (observate la microscopul electronic cu transmisie), au putut fi identificate unele aspecte (fig. 31), care nu au mai fost surprinse în celulele altor tipuri de fitoinoculi, respectiv în mezofilul asimilator sau în calusurile de garoafe, ori în cel de crizanteme. Astfel, la această specie, *Cachiță* şi *Crăciun* (1990) au relevat existența unor masive depozite de amidon, în stroma cloroplastelor prezente în mezofilului foliar al frunzulițelor *hiperhidrice*, ceea ce a provocat transformarea acestora în amiloplaste (vezi fig. 42A-C); în schimb, citoplasma celulelor *hiperhidrice* a fost puternic rarefiată, iar mitocondriile din acestea au prezentat cristele dilatate (fig. 42D). În sucul vacuolar (fig. 43A-D), chiar şi în vacuolele mici (fig. 43D), s-a remarcat abundența corpusculilor sferici, puternic electrondenşi, de tipul lipozomilor, apreciați de noi ca fiind de natură fosfolipidică. În citoplasmă (ca şi în cazul calusului *vitrificat* de garoafe), uneori, s-a putut observa prezența unor mari picături lipidice, de tipul oleoplastelor (fig. 29D). În sucul vacuolar al celulelor vitrofrunzulițelor *hiperhidrice*, de *Forsythia*, au putut fi identificate şi conglomerate masive, posibil de natură minerală (fig. 43A), precum şi formațiuni sferoidale mari (fig. 43B), constituite, probabil, din microfibrile mucilaginoase.

O parte dintre fenomenele surprinse în organitele din citoplasma celulelor aflate în mezofilul foliar *vitrificat* se regăsesc şi în celulele parenchimului *calusal* de *Forsythia* (fig. 43C şi D), cu mențiunea că, după un timp îndelungat de vitrocultură acest calus a devenit roşcat, din cauză că celulele superficiale ale acestuia au deținut capacitatea de a sintetiza şi a acumula antociani, în sucul lor vacuolar, compuşi care – într-o stare primară – sunt incolori (leucoantociani). Antocianii au capacitatea de a se interpune în structurile fosfolipidice ale lipozomilor vacuolari prezenți în celulele vegetale, mai ales la cele în curs de senescență, fapt care ar putea explica abundența acestora în celulele țesuturilor *hiperhidrice*.

În parenchimul palisadic al vitrofrunzulițelor *hiperhidrice* ale plantulelor de prun, *Franck* şi colaboratorii (1997) au identificat existența unui număr mai redus de cloroplaste, decât în celulele similare ale vitroplantulelor normale.

În anul 1999, un colectiv ce cercetători din Brazilia, condus de către *Fontes*, a publicat o sumă de rezultate cu privire la diferite aspecte ultrastructurale întâlnite în celulele *hiperhidrice* ale plantulelor de ardei, regenerate *in vitro*. În cloroplastele parenchimului palisadic al vitrofrunzulițelor *hiperhidrice*, autorii citați au descris prezența unor masive depozite de

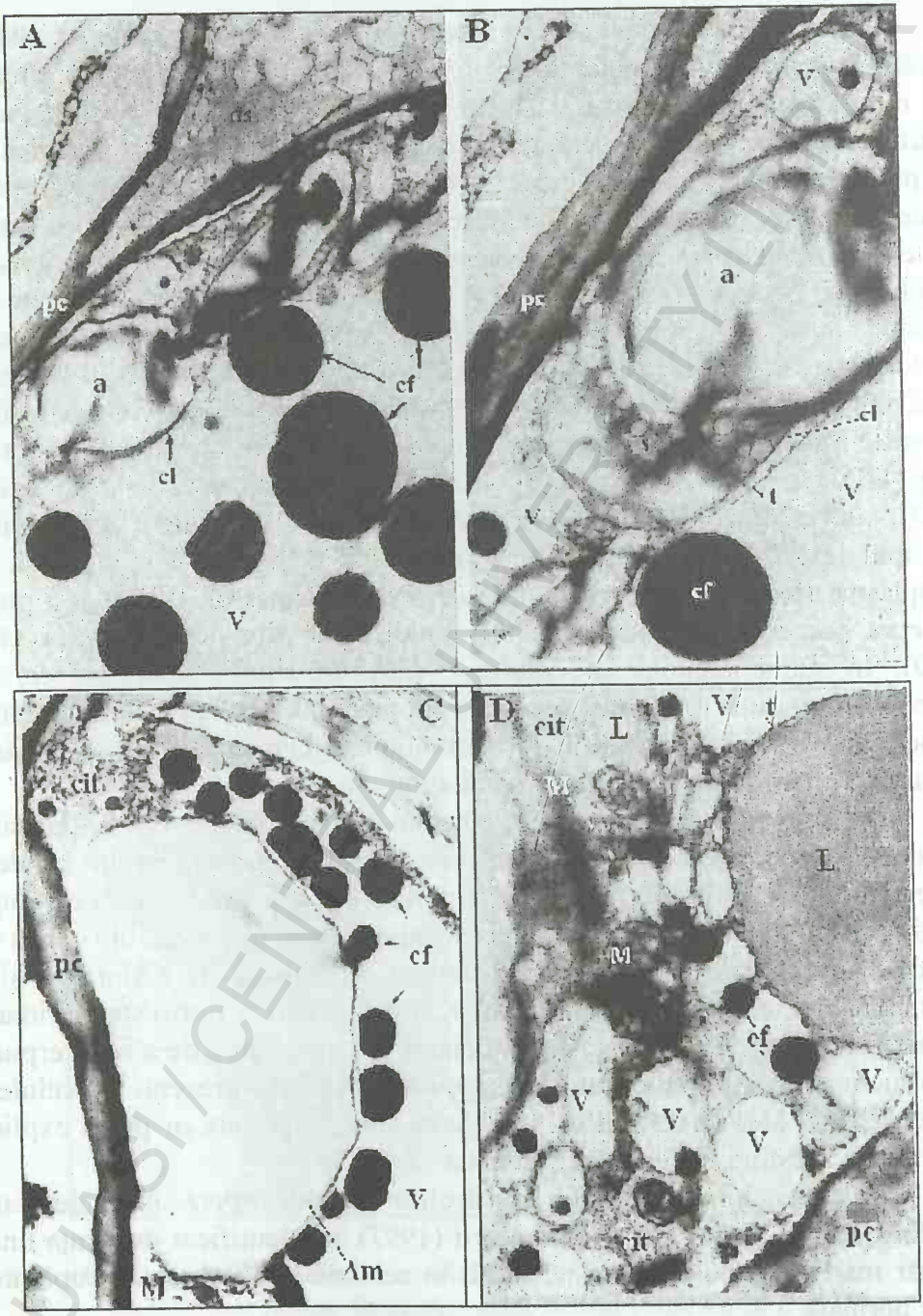


Fig. 42. Imagini ultrastructurale surprinse în mezofilul foliar al *frunzulițelor hiperhidrice* de *Forsythia* sp. (A-C – cloroplaste în curs de transformare în amiloplaste; D – detaliu din citoplasmă; A – 6800x; B – 600x; C – 8000x; D – 8000x) (unde: a – amidon; Am – amiloplast; cit – citoplasmă; cl – cloroplaste; cf – corpusculi fosfolipidici; L – picături lipidice; M – mitocondrii; pc – perete celular; ds – depuneri secundare pe peretele epidermal, extern; t – tonoplast; V – vacuolă) (*Cachiță* și *Crăcium*, 1990).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

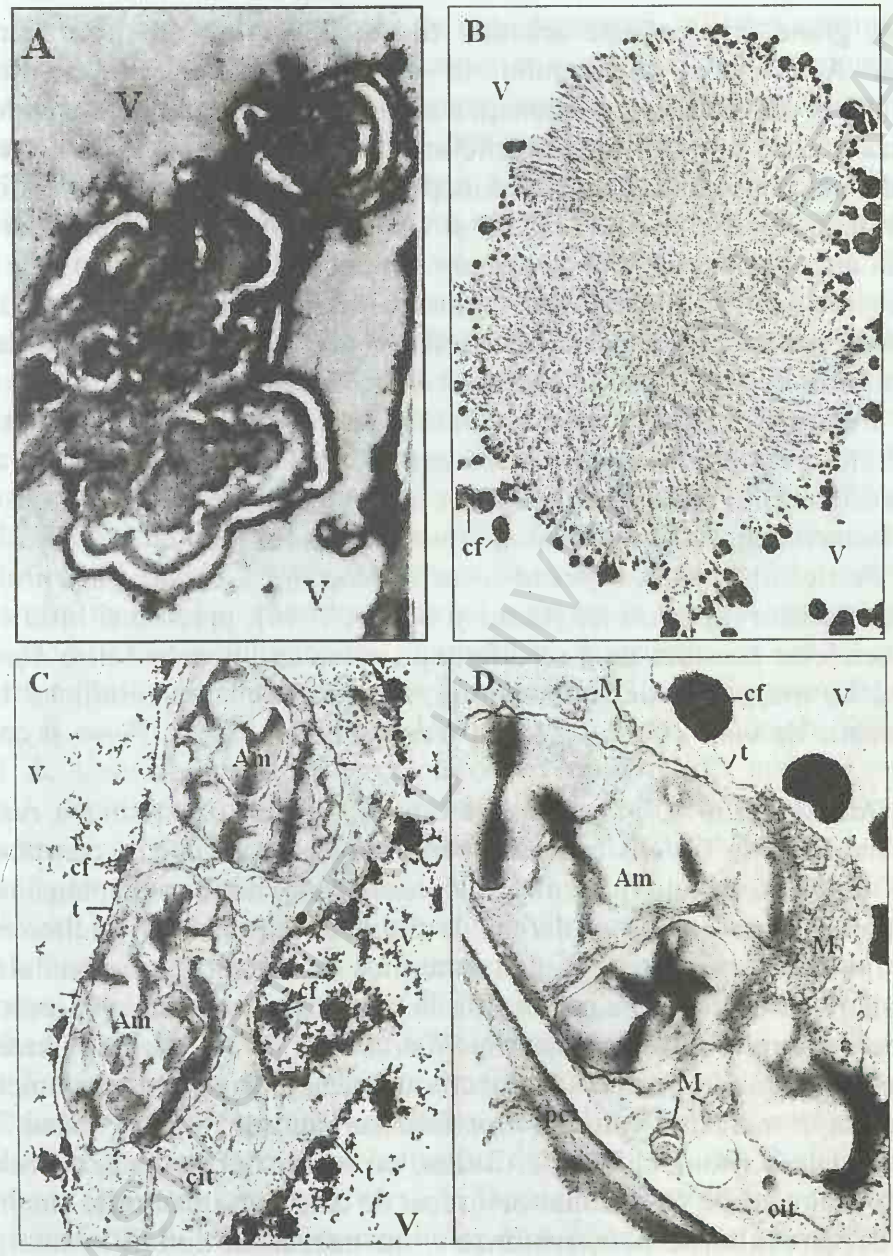


Fig. 43. Imagini electronomicroscopice (surprinse la microscopul electronic cu transmisie) identificate în vacuolele celulelor *mezofilului foliar* al vitrofrunzulițelor *hiperhidrice* de *Forsythia* sp. (A – conglomerat amorf, de săruri minerale: 21000x; B – formațiune sferoglobuloasă, filamentoasă, prezentă în sucul vacuolar: 3360x; C și D – aspecte observate în celulele parenchimatice ale *calusului hiperhidric* de *Forsythia*, imagini care relevă, în special, transformarea cloroplastelor în aminoplaste; C – 5700x; D – 14.000x) (unde: Am – amiloplast; cit – citoplasmă; cf – corpusculi fosfolipidici; M – mitocondrii; pc – perete celular; t – tonoplast; V – vacuolă) (*Cachiță* și *Crăciun*, 1990).

amidon, grane cu densitate scăzută, tilacoide în curs de dezorganizare, ș.a.m.d. Acumularea amidonului în cloroplastele celulelor țesuturilor hiperhidrice, după autorii menționați, semnifică o perturbare a proceselor de mobilizare și de transport a substanțelor rezultate din fotosinteză, către alte zone, din cauza producerii unor disfuncții în ceea ce privește permeabilitatea biomembranelor. Ca și noi (*Cachiță* și *Crăciun*, 1990), ei au semnalat prezența în citoplasma celulelor *vitrificate* a mitocondriilor cu criste bine dezvoltate și a peroxizomilor cu mari incluziuni cristaline în matricea lor; astfel de situații au fost mult mai frecvente în celulele mezofilului foliar al vitrofrunzulițelor suferinde de *hiperhidrie*, decât în cele normale.

Fontes și colaboratorii lui au considerat că, schimbările produse la nivelul cloroplastelor comportă o scădere a capacității fotosintetice a acestora, precum și un redus conținut al lor în clorofilă, ceea ce constituie unul dintre factorii majori, responsabili de translucidizarea plantelor *hiperhidrice*.

Pe de altă parte, *deficitul sever în clorofilă* – existent în vitrofrunzulițele lăstarilor *hiperhidrici* (*Ueno* și *Shetty*, 1996), precum și lipsa capacității celulelor acestora de a se diferenția – fac ca vitroplantulele *hiperhidrice* să fie incapabile de supraviețuire, în momentul transferării lor la un regim septic de viață (*Cachiță*, 1987; *Ueno* și colab., 1998; *Perry* și colab., 1999).

Radoveț (2007), în teza sa de doctorat, axată pe studierea reacției vitroplantulelor de *Coleus* la condiții ecofiziologice variate, a constatat, și ea, că vitrofrunzulițele plantulelor *hiperhidrice*, după o săptămână de vitrocultură, au prezentat un deficit de pigmenți clorofilieni, indiferent de natura iluminării utilizate, cea mai puternică descreștere a conținutului în pigmenți remarcându-se la vitroculturile iluminate cu tuburi fluorescente emitente de lumină roșie, minusul înregistrat fiind de 33,5%; la o iluminare a culturilor cu lumină verde și respectiv cu cea galbenă, acest parametru a fost mai puțin marcat la culturile *hiperhidrice* minusul fiind de numai 28%; la o iluminare a fitoinoculilor de *Coleus*, cu tuburi fluorescente de culoare albastră – minusurile față de martor au fost de doar 19%. Culturile *vitrificate* – față de vitroculturile *nehiperhidrice* – au marcat un deficit în total pigmenți verzi de 22%, cel mai afectat fiind conținutul în clorifilă **b**, la care minusurile înregistrate au fost de 24,6%; în cazul clorofilei **a**, descreșterea a fost de numai de 10%, iar în cel al pigmenților carotenoidici scăderea a fost de numai 9%.

Dacă ne referim la cele două specii de *Coleus*, luate în studiu, pierderile în pigmenți asimilatori totali, înregistrate la vitrofrunzulițele *hiperhidrice* de *C. blumei* Benth. au fost mai mari cu 18,9%, decât cele marcate la probele obținute din organul similar *hiperhidric* provenit de la vitroplan-

tulele de *C. hybridus* Jupiter, ceea ce dovedeşte variabilitatea acestui parametru în funcţie de specie. De menţionat este faptul că, vitroplantulele *hiperhidrice* de *Coleus* nu au avut capacitatea de a se putea aclimatiza la regimul de viaţă „ex vitro" (*Radoveţ*, 2007).

În altă ordine de idei, *Debergh* şi colaboratorii (1981) şi *Vieitez* şi colaboratorii (1985) au fost de părere că, în raport cu aria de extindere a *zonei meristematice în domul apical* al tulpinităelor normale, în lăstarii *hiperhidrici* această formaţiune este mai restrânsă ca arie. Totodată, din structura domului meristematic al tulpinităelor *vitrificate* lipseşte procambiul, promeristem care coboară bazipetal din primordiile foliare în ţesuturile ce urmează să se diferenţieze, fapt care face ca în tulpinităele *hiperhidrice* să existe un număr redus de fascicule conducătoare. Acestea, însă, prezintă o dispunere caracteristică acelora din tulpinităele normale (*Leshem*, 1983a; *Ziv* şi colab., 1983; *Cachiţă* şi *Crăciun*, 1990; *Gaspar*, 1991; *Franck* şi colab., 1998; *Perry* şi colab., 1999). Din punct de vedere anatomic, *hiperhidria* şi hipertrofia ţesuturilor afectate de acest sindrom a determinat producerea unor modificări histologice nu numai în frunzulităe, ci şi la nivelul parenchimului cortical al tulpinităelor (*Leshem*, 1983 a, b; *Ziv* şi colab., 1983; *Vieitez* şi colab., 1985; *Olmos* şi *Hellin*, 1998; *Picoli* şi colab., 2001), în astfel de ţesuturi spaţiile intercelulare devenind foarte mari (*Kevers* şi *Gaspar*, 1986), iar celulele lor având un aspect malformat, în secţiune, adeseori, ele prezentând un contur diform (fig. 33D şi 34A şi B).

În urma cercetărilor efectuate de către noi (*Cachiţă* şi *Hurgoiu*, date nepublicate), situaţia întâlnită în tulpinităele vitrificate de *Asparagus* (sparanghel) a fost întrucâtva diferită de aceea descrisă la vitrolăstarii altor genuri. În primul rând, în cazul culturilor de *Asparagus*, trebuie să avem în vedere faptul că frunzele acestor plante, atât cele din natură, cât şi cele din *vitrocultură*, sunt atrofiate, clorenchimul lor fiind localizat exclusiv în tulpini, ele fiind acelea care efectuează asimilaţia clorofiliană. În această situaţie, în lăstăraşii regeneraţi la nivelul culturilor de calus (fig. 44 B şi C), ţesutul asimilator (clorenchimul) este sărac în lacune, iar spaţiile intercelulare sunt relativ mici. Ca şi în cazul frunzulităelor *hiperhidrice* de la alte specii, celulele situate la periferia tulpinităelor *vitrificate* au fost mult mai sărace în clorofilă, iar cloroplastele lor au fost aplatizate (de comparat imaginile surprinse în tulpinităele asimilatoare, normale – fig. 44A – transformate în cladodii, la vitroplantule provenite din embrionii zigotici ai seminţelor germinate în condiţii aseptice, cu cele din fig. 44B, ce prezintă celulele parenchimului asimilator existând în lăstăraşii *vitrificaţi*, regeneraţi la nivelul calusurilor *hiperhidrice*, de sparanghel). Pe lângă aceste aspecte, imaginile electronomicroscopice surprinse în celulele lăstăraşilor vitroplantulelor normale sau a

celor *hiperhidrice* și cele observate în celulele *calusului* vitrocultivat și *hiperhidric* (fig. 44C), de origine caulinară, în vacuolele suferinde de sindromul *vitrificării* se observă prezența unor formațiuni sferoidale, electrondense, descrise de *Cachiță* și *Crăciun* (1990) și în vacuolele celulelor calusului *hiperhidric* de *Forsythia* (fig. 42A), corpusculi considerați de noi ca fiind de natură fosfolipidică, cu adiționarea în aceste structuri de tip lipozomal, probabil, a unor leucoantociani.

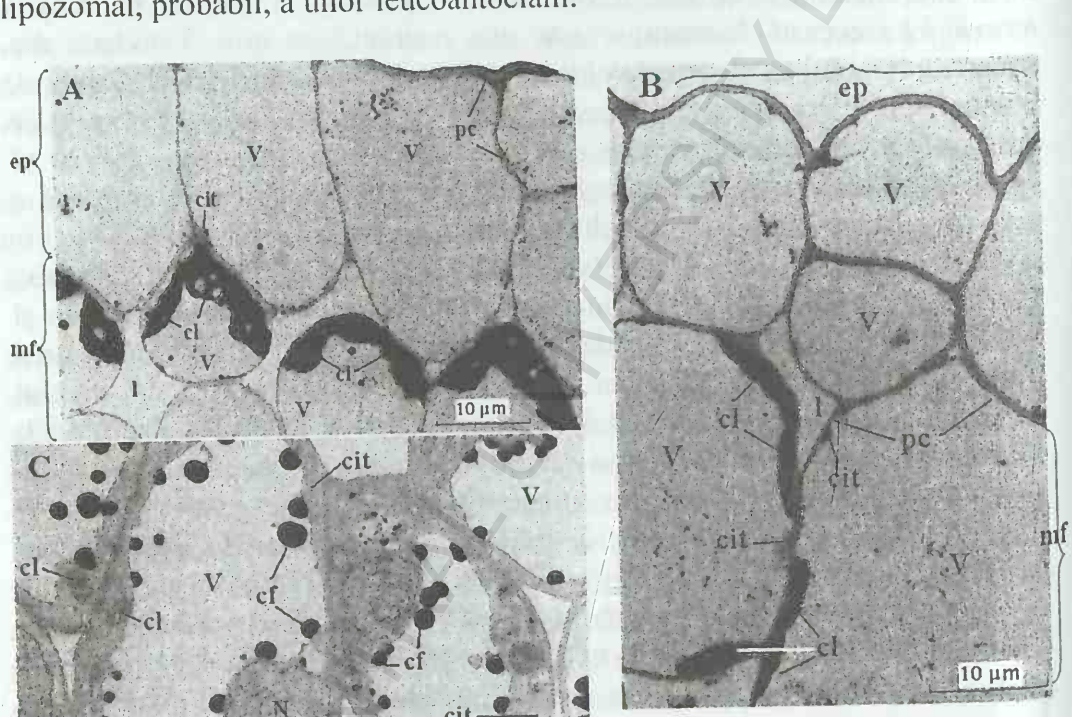


Fig. 44. Imagini surprinse la microscopul electronic cu transmisie, în tulpinițele de sparanghel (*Asparagus officinalis*) (A – tulpinițe normale regenerate *in vitro* din semințe germinate în regim aseptic; B – lăstari *hiperhidrici* neoformați la nivelul *calusului vitrificat* și C – țesut calusal *hiperhidric*, neoformat din inoculi caulinari) (unde: cit – citoplasmă; cl – cloroplaste; cf – corpusculi fosfolipidici; ep – epidermă; l – lacună intercelulară; pc – perete celular; mf – mezofil foliar; V – vacuolă).

După *Leshem* și *Sachs* (1985), în cazul vitrotulpinițelor profund *vitrificate*, în general, *rizogeneza* este foarte slabă, la baza lăstarilor neogeneza de rădăcinițe adventive fiind nereprezentativă (*George*, 1996). Cu toate acestea, *Aitken-Christie* și colaboratorii (1985) au specificat că,

lăstarii *hiperhidrici* de *Pinus radiata* – deşi iniţial au exteriorizat o rizogeneză „anemică" – în timp ei îşi manifestă această capacitate.

În anul 1986, *Gersani* şi colaboratorii au constatat, în urma cercetărilor efectuate de către ei, că în vitroplantulele *hiperhidrice* s-a identificat o scădere a transportului polar de auxină, ceea ce ar putea explica slaba capacitate rizogenă a acestora *in vitro* fiind, sau *ex vitro*, în perioada de aclimatizare a lor la mediul natural de viaţă (n.n.).

Pe de altă parte, *Pierik* (1989) a semnalat, la unii lăstari *hiperhidrici*, o insensibilizare a acestora la existenţa *auxinei* în mediul de cultură, ei fiind lipsiţi de reacţie *rizogenă*, cu toate că acest fitohormon a fost prezent în substrat, în concentraţii optime, şi ar fi trebuit să inducă, şi să susţină, procesul de formare al rădăcinilor; dar, se pare că *vitrificarea* produce o anihilare sau o atenuare – uneori temporară – a capacităţii fitohormonilor de a demara generarea de rădăcini.

În altă ordine de idei, după cum am mai menţionat, în condiţii aseptice *transparentizarea* ţesuturilor organelor atinse de *hiperhidrie* se poate instala rapid, în timp ce celelalte modificări morfofiziologice caracteristice procesului de *vitrificare* se petrec pe parcursul a mai multor zile sau săptămâni de vitrocultură, ele fiind profunde, atât de natură morfoanatomică, cât şi funcţională. De exemplu, întrucât în *hiperhidrie* spaţiile intercelulare ale vitroplantulelor sunt inundate cu apă, iar aerul din interstiţiile tisulare este evacuat, în celulele unor astfel de ţesuturi se produce instalarea unui grad ridicat de *anaerobioză*, ceea ce aduce serioase prejudicii metabolismului general, îngreunând *schimburile* efectuate la nivel de biomembrane, dezechilibrându-se şi diminuându-se, totodată, bilanţul energetic al celulelor. Legat de această transformare, la vitrofrunzuliţele *hiperhidrice* de garoafe, *Saher* şi colaboratorii (2004; 2005 a şi b) au observat, că *hipoxia* se constituie într-un factor major, care din punct de vedere metabolic marchează profund celulele afectate de acest sindrom fiziologic, în primul rând prin scăderea nivelului de ATP şi de *glucochinază* din acestea, şi prin creşterea activităţii *glucozo-6-fosfat dehidrogenazei* din ele; pe de altă parte, în ţesuturile *hiperhidrice* nu s-a remarcat producerea unor schimbări semnificative în ceea ce priveşte *nucleotidele piridinice*, însă s-a constatat o inhibare a *piruvatsintetazei* (via NADP, dependent de malic enzimă), ceea ce indică o afectare a *metabolismului piruvatului*. Totodată, autorii citaţi au observat că, în frunzuliţele *hiperhidrice* a fost crescută activitatea enzimelor implicate în metabolismul *piruvatdecarboxilic* şi a celui *alcooldehidrogenazic*. La cele arătate, trebuie adăugat şi faptul că, în celulele marcate de acest sindrom, *metabolismul glucidic* a fost afectat în urma creşterii activităţii enzimelor

implicate în variate căi de sinteză sau de catabolism, în ele semnalându-se creşteri ale nivelului de zaharoză, de glucoză şi de fructoză.

În literatura de specialitate se mai menționează şi aspectul potrivit căruia, vitroplantulele *hiprehidrice* prezintă şi un deficit al capacității țesutului lemnos de a se *lignifica*, în special a vaselor xilemice (*Beauchesne*, 1981; *Vieth* şi colab., 1983; *Kevers* şi colab., 1984, 1985; *Daguin* şi *Letouzé*, 1985; *Vieitez* şi colab., 1987; *Olmos* şi colab., 1997; *Ueno* şi colab., 1998). Pe de altă parte, este cunoscut că *etilena* nativă (după *Roberts* şi *King*, 1982, şi după *Fukuda* şi *Komamine*, 1985) este un factor promotor al *lignificării*. În cazul *hiperhidriei* se pare că *deficitul de lignină*, respectiv slaba lignificare a celulelor xilemice şi a celor sclerenchimatice, este motivat de producerea unui excedent de *etilenă* atât în țesuturile vitrocultivate, cât şi în atmosfera din recipientele de cultură, dezechilibru ce perturbă procesul de lignificare. Totodată, se cunoaşte că, *peroxidazele* sunt implicate în sinteza *ligninei*, iar *schimbările* produse în *activitatea peroxidazică* sunt corelate cu generarea *hiperhidriei* la nivelul organelor vitroplantulelor (*Letouze* şi *Daguin*, 1983; *Kevers* şi colab., 1984). Dar, în vitroinoculii *hiperhidrici* s-a observat o creştere a activității *peroxidazice*, fenomen care a fost corelat cu o stimulare a *catabolismului auxinic* (*Kevers* şi colab., 1984; *Kevers* şi *Gaspar*, 1985 a; *Gaspar*, 1986; *Gaspar* şi colab., 1987; *Olmos* şi colab., 1997). *Piqueras* şi colaboratorii (2002) şi *Balen* şi colaboratorii (2003), în *calusul hiperhidric* de cactus (*Mammillaria gracilis* Pfeiff.), au identificat o activitate *peroxidazică* şi *esterazică* de 6-7 ori mai mare decât în *calusul* normal.

Studiile menționate, nefiind făcute pe acelaşi tip de fitoinoculi este greu ca pe baza rezultatelor obținute de către diferiții autori să se elaboreze concluzii pertinente, explicite, cu privire la implicațiile diferitelor compartimente metabolice, enumerate anterior, în instalarea şi consecințele stării de *hiperhidrie*.

Dar, trebuie să menționăm şi faptul că, *citochininele* sunt cunoscute ca fiind stimulatoare ale biosintezei de *etilenă*, în acelaşi timp ele inhibând unele efecte exercitate de *etilenă* asupra creşterii plantelor (*Burg* şi *Burg*, 1968). *Etilena* fiind implicată în inducerea *hiperhidriei*, se poate specula ideea că tendința *citochininelor* de a provoca *vitrificarea*, poate că se corelează cu producerea unei cantități sporite, anormale, de *etilenă* în țesuturile plantei vitrocultivate.

După *Roberts* şi *Miller* (1983), excedentul de *etilenă* (fitohormon promotor al producerii *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor), din atmosfera recipientelor de cultură în care se găsesc vitroplantule *vitrificate*, poate inhiba sinteza acesteia şi, drept consecință, în celulele *hiperhidrice* se instalează

un proces de scădere a activității PAL (phenil-alanin-amoniu-liazei), enzimă implicată atât în *lignificare*, cât și în reglarea nivelului de *peroxidaze acide*. Acest ansamblu de reacții biochimice conduce la împiedicarea *lignificării* celulelor, implicit a celor care au în programarea lor genetică aptitudini de diferențiere, de acest tip.

După părearea lui *Kevers* și colaboratorii (1984; 1987), vitrofrunzulițele *vitrificate* prezintă și o descreștere a *sintezei* de *celuloză*, din cauza dereglării – în celulele *hiperhidrice* – a *metabolismului glucidic*; în schimb, ei au precizat că, în paralel, în aceste tipuri de celule se accentuează procesul de sinteză al *aminoacizilor*. Pe de altă parte, deficitul de celuloză și de lignină, manifest în țesuturile *hiperhidrice*, permite absorbția mai intensă a apei în celulele de acest tip, fapt care, în timp, duce la o acumulare excedentară a ei în spațiile intercelulare, din imediata apropiere a acestora. Pereții celulelor *vitrificate* fiind subțiri, aceștia sunt mai extensibili și sub presiunea apei ei se deformează ușor, fiind mult scăzută capacitatea lor de contrapresiune, forță menită să contrabalanseze creșterea volumului vacuolar, prin acumularea în interiorul acestora a unui excedent de apă, sau prin presiunea exercitată de apa strânsă în spațiile intercelulare provenite din exosmoză (*Kevers* și colab., 1987; *Olmos* și colab., 1997). Acestă situație, în ansamblul ei, face ca celulele respective să treacă printr-un fenomen de „malformare *hiperhidrică*". Dar, cu toate că în spațiile intercelulare ale vitroplantulelor *hiperhidrice* se acumulează un surplus de apă, protoplastul *vitrificat* s-a demonstrat că deține mai puțină apă decât cel al celulelor normale (*Kevers* și *Gaspar*, 1986; *Pâques* și *Boxus*, 1987 b).

În lichidul colectat în spațiile intercelulare se pare că, prin capilaritate, se infiltrează o parte dintre ionii prezenți în mediul de cultură (*Bötteher* și *Göring*, 1987). Această situație, de fapt, generează un alt factor stresant, din cauza oscilației compoziției ionice a mediului interstițial, în aceste zone creându-se o stare de șoc hiperosmotic (*Kevers* și *Gaspar*, 1986). La vitroplantulele înrădăcinate, absorbția radiculară fiind prezentă, ea previne acest tip de infiltrație, ceea ce explică, parțial, de ce la plantulele înrădăcinate *hiperhidria* nu se produce, sau se instalează mai slab și are consecințe mai puțin severe.

În celulele vitroplantulelor *hiperhidrice* de crizanteme, *Kevers* și *Gaspar* (1986) au observat o scădere a concentrației ionilor de Ca, de Mg și de Na, și o creștere a concentrației celor de K. Ulterior, tot *Kevers* și colaboratorii (1988) au constatat că vitroplantulele *hiperhidrice* prezintă o concentrație mică de ioni de Ca în celule, un raport mai scăzut între ionii de Ca și acidul uronic, precum și între acesta din urmă și glucidele neutre, situație care, după autorii citați, ar explica capacitatea plastică mai crescută a pere-

ților celulari ai fitoinoculilor suferinzi de acest sindrom (*Kevers* și colab., 1987).

În raport cu probele recoltate de la fitoinoculii normali, la culturile *hiperhidrice*, *Zimmerman* și colaboratorii (1988b) au observat (și ei), în țesuturile afectate de acest sindrom, existența unui conținut scăzut de Ca, de inozitol și de proteine solubile, și un nivel sporit de K, de P, de glucoză și de zaharoză.

După cum a precizat *Gaspar* (1991), și ulterior *Debergh*, împreună cu colaboratorii lor (1992), *hiperhidria* este o „dezordine fiziologică" (morfofiziologică – n.n), care afectează nu numai țesuturile organelor vitroplantulelor, ci și celulele *calusale*, atinse de fenomenul de *vitrificare*, aflate în regim de vitrocultură. Din această cauză, *calusul hiperhidric* dobândește un aspect sticlos și o textură laxă (*Cachiță* și colab., date nepublicate), friabilă, el fiind constituit din celule parenchimatice malformate și diforme, ce cresc luxuriant. Din punctul de vedere al lui *Crèvecoeur* și colaboratorii (1987), precum și al lui *Gaspar* (1991), de regulă țesutul *calusului hiperhidric* este depigmentat și lipsit de elemente de xilem. La cele arătate, adăugăm și faptul că, în general, celulele țesutului calusal *hiperhidric* își pierd capacitatea de diferențiere, respectiv de *morfogeneză* (de organogeneză sau de embriogeneză somatică) (*George*, 1996). Contrar celor afirmate de către *George* (1996), referitor la scăderea capacității de organogeneză a calusurilor *hiperhidrice*, la *Asparagus*, *Cachiță* și *Hurgoiu* – la nivelul calusului vitrificat – au observat existența unei puternice capacități de caulogeneză, respectiv de lăstărire (fig. 30B-E).

În urma cercetărilor efectuate de către *Lavee* și *Messer* (1969), prezența *hiperhidriei* la nivelul *calusului* este ușor de demonstrat, prin determinări gravimetice. În plus, în *calusul hiperhidric* de măslin, ei au identificat un conținut scăzut al acestuia în clorofilă **a** și un nivel mai ridicat de clorofilă **b**, decât la calusul nevitrificat.

În general, geneza de *calus hiperhidric* (țesut utilizat ca model experimental într-o multitudine de experimente de morfofiziologie) poate fi realizată relativ ușor, de exemplu la garoafe, acest proces este declanșat prin inocularea unor explante de tip foliar pe un mediu de cultură care să aibă în compoziția lui, ca regulatori de creștere, un ameste de 2,4-D cu BA. Uneori, însă, o subcultivare a *calusului*, chiar și pe același tip de mediu, a condus la regenerarea la nivelul acestuia de muguri și de lăstari *hiperhidrici* (*Jain* și colab, 2001), fapt constatat și de către noi atât la garoafe, cât și la sparanghel (fig. 30B-E) (*Cachiță* și *Hurgoiu* – lucrare aflată sub tipar).

Kataeva și colaboratorii (1991) au arătat că, în unele cazuri, pe lângă faptul că tulpinițele *hiperhidrice* pot fi mai lățite decât cele normale,

BCU "ALEXANDRU IOAN CUZA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

marginile limburilor foliare prezente pe ele se *necrozează*. În situația în care la nivelul tuturor meristemelor unui inocul se instalează fenomenele de *necroză* (uneori simultan), individualizarea și subcultivarea unor fragmente prelevate din părțile încă viabile ale acestora nu este realizabilă, deoarece țesuturile respective, după repicare, se brunifică și, în final, inoculii mor. Comparativ cu *necroza* provocată *in vitro*, din cauza producerii unui deficit hormonal la nivelul celulelor – fenomen denumit *necroză uscată* – forma de *necroză* apărută la nivelul apexurilor meristematice a fost considerată ca fiind de tip *umed* (după *George*, 1996).

La speciile lemnoase cultivate *in vitro*, *hiperhidria* fitoinoculilor poate conduce și la o *juvenilizare* a materialului de plantat rezultat din micropropagare, caracter care, uneori, poate deveni chiar o calitate (*John*, 1986; *Coumans* și *Ribet*, 1993).

Ulterior, *Giusti* și colaboratorii (2002) au constatat că prezența în mediul de cultură *Murashige – Skoog* (1962) a *tidiazuronului* [1-fenil-3-(1-2-3-tiadiazol-5yl) uree] (TDZ), la fitoinoculii de cactuși: *Escobaria minima, Mammillaria pectinifera* și *Pelecyphora aselliformis*, a indus intensificarea creșterii ratei lor de proliferare, fenomen soldat cu formare abundentă atât de *calus*, cât și de mugurași axilari, dar *hiperhidrici*. După autorii citați, un astfel de fenomen a fost prezent numai la vitroculturile efectuate pe acel tip de mediu de cultură, procesele menționate nefiind manifeste la culturile similare inoculate și crescute pe medii cu adaos de BA sau de ANA.

După cum s-a mai arătat, în literatura de specialitate există o multitudine de cercetări cu privire la tabloul *biochimic* surprins în celulele fitoinoculilor *hiperhidrici*. În anii `80, *Letouzé* și *Daguin* (1983) și *Daguin* și *Letouzé* (1986) au semnalat existența unei mai crescute activități *glutamat-dehidrogenazice*, în vitroplantulele *hiperhidrice*, față de nivelul acestei enzime înregistrat în plantulele similare vitrocultivate, dar care nu au suferit o astfel de transformare. Mai apoi, *Kevers* și colaboratorii (1984) și *Perry* și colaboratorii (1999) au constatat că, în celulele *hiperhidrice* există o cantitate scăzută de *fenoli* solubili.

Unii autori, cum sunt *Hagège* și colaboratorii (1990a; 1994) și *Le Dily* și colaboratorii (1993) au fost de părere că, la culturile *hiperhidrice* există și o *deviere* a *metabolismului azotului*, fenomen concretizat printr-o creștere treptată, în celulele afectate de acest proces, a conținutului lor în *poliamine*, constatare la care au subscris și *Porciani* și colaboratorii (1993). Dar, *Le Dily* (1993) a observat că, în *calusul habituat* și *hiperhidric* sporește producția de *poliamine* în celule, calea *porfirinică* este blocată, și se *reduce* activitatea *catalazică* și cea *peroxidazică*. Aceste procese conduc la *îngreunarea detoxifierii* celulelor de excedentul de H_2O_2 acumulat în ele, peroxid

care a fost incriminat – de către autorul citat – ca fiind principalul responsabil de *dezechilibrele metabolice* produse în celulele *hiperhidrice*, fenomene care conduc, în final, la *vitrificarea* fitoinoculilor, din cauza acumulării continue în ele de radicali OH, ceea ce explică hipoxidarea manifestată în spectrul structurilor celulare. Administrarea exogenă de *poliamine*, în mediul de cultură al calusurilor de *Panax ginseng*, a diminuat capacitatea de embriogeneză la nivelul acestora, inducând *vitrificarea* și brunificarea lor (*Kevers* și colab., 2002).

După *Bisbis* și colaboratorii (1993), și *Carrié* și colaboratorii (1994), în celulele *hiperhidrice* are loc și o *disturbare* a *metabolismului glucidic* și *porfirinic*, tablou biochimic care implică pe lângă modificarea activității *peroxidazice* (a celor acide și a celor bazice, precum și a *ascorbat peroxidazei*) și alterarea activității altor enzime, cum este, de exemplu, al *catalazei* (*Kevers* și colab., 1981; *Gaspar* și colab., 1988; *Hagège* și colab., 1992c; *Le Dily*, 1993c; *Franck* și colab., 1995). Ulterior, *Piqueras* și colaboratorii (2002), la vitroplantulele *hiperhidrice* de garoafe, au remarcat, pe lângă existența unei modificări a nivelului de *poliamide*, în special a celor libere (fenomen combinat cu o activitate *peroxidazică* ridicată și o *lignificare* slabă, precum și o depleție completă a *1,3-diaminopropanului*), și o creștere a conținutului în *malondialdehide* și a formelor *aminoconjugate* ale 1,3-*diaminopropanului*. În anul 2004, *Saher* și colaboratorii au adus noi informații cu privire la aceea că, în raport cu vitroplantulele normale, cele *hiperhidrice* au cantități mult mai mari de *malondialdehide*, de *etilenă* și de Fe. Totodată, ei au semnalat și existența în aceste celule a unei activități sporite a tuturor *enzimelor antioxidante*, cu excepția *lipoxigenazei*.

În altă ordine de idei, *Le Dily* și colaboratorii, în anul 1998 au adus precizări referitoare la faptul că, în celulele țesuturilor *hiperhidrice* sunt perturbate atât procesele de *permeabilitate*, desfășurate la nivel de *biomembrane* (inclusiv în ceea ce privește apa), cât și *metabolismul elementelor* C, N și S. Din această cauză, celulele de acest tip acumulează excedentar compuși *fenolici*, procese care sunt asociate cu o scădere a producției de *hemoproteine*, o creștere a concentrației de H_2O_2 (peroxid responsabil, după cum am mai amintit, de instalarea în celule a unui *stres oxidativ*, permanent) în celule, precum și o hipometilare a ADN-ului, fenomene care conduc – în ansamblul lor – la *cancerizarea* celulelor aflate într-o astfel de situație.

Școala belgiană de *fitohormonologie* de la Liège, care a fost condusă – timp de mai mulți ani (1970-1995) – de către profesorul *Gaspar*, s-a preocupat îndeaproape nu numai de problema hormonilor vegetali și a efectelor regulatorilor de creștere, ci și de studierea fenomenelor de *hiperhidrie* și a celor de *habituație*. Un alt aspect investigat profund de către acest colectiv

universitar a fost acela al *peroxidazelor* vegetale. Treptat, cercetătorii respectivi şi-au extins cercetările şi asupra elucidării proceselor care stau la baza ***cancerizării*** celulelor vegetale, mai ales a celor aflate în regim de vitrocultură. Din colectivul amintit, *Franck* şi colaborartorii (1994 şi 1995) au semnalat că inoculii de *Prunus avium*, faţă de situaţia unor *parametri biochimici* determinaţi în lăstarii normali, cultivaţi pe medii solidificate cu *Gelrit*, au regenerat lăstari cu un conţinut ridicat în *superoxiddismutaze*, metaloenzime care catalizează transformarea superoxidului $O_2^{\bullet -}$ şi a hidroxilului .OH_1, în H_2O_2 şi în O_2. Ulterior, *Franck* şi colaboratorii (1997) au relevat şi faptul că, *hiperhidria* vitroplantulelor a fost considerată, adeseori, ca o exteriorizare – pe plan morfologic – a reacţiei ţesuturilor şi a celulelor vitrocultivate, la *acţiunea stresantă* exercitată de un *complex de factori* de mediu, condiţii care se crează, uneori, în special în situaţia vitrocultivării fitoinoculilor.

Tot după *Franck* şi colaboratorii (1995; 1998), şi *Olmos* şi colaboratorii (1997; 2004), în *hiperhidrie*, **stresul oxidativ** implică, endocelular, prezenţa unor radicali liberi de tipul *superoxidului* ($O_2^{\bullet -}$), a *hidroxidului* (.OH), precum şi a *peroxidului de hidrogen* (H_2O_2), radicali care neanihilaţi chimic, în timp, se constituie în importanţi factori stresanţi şi distructivi. În special, *Olmos* şi colaboratorii (1997) au asociat fiziologia *hiperhidriei*, *stresului oxidativ*, acest proces aflându-se sub incidenţa acţiunii *enzimelor oxidative*, fenomene biochimice interrelaţionate cu *nutriţia minerală* şi cu concentraţia *etilenei* existente în sistem.

Saher şi colaboratorii (2004) au fost de părere că H_2O_2 (peroxid generat şi acumulat cu predilecţie în celulele ţesuturilor *vitrescente*), caracterizează răspunsul acestora la *sistemul antioxidant al stresului oxidativ*; acumularea de H_2O_2, în celulele *vitrificate* – de exemplu, în cele ale frunzuliţelor *hiperhidrice*, de garoafe – induce o parte dintre anomaliile descrise în *hiperhidrie*. După aceşti autori, în celulele atinse de *hiperhidrie*, o mărire a concentraţiei de *superoxiddismutaze* determină o scădere a nivelului de *guaiacolperoxidază*, de *ascorbatperoxidază*, de *catalază*, de mono- şi *dehidroascorbat*, precum şi de *glutationreductaze*; cu ceva timp înainte – 1994 – o parte dintre aceste aspecte au fost semnalate şi de către colectivul de cercetători condus de către *Franck* (după *Herman*, 1994). *Saher* a sugerat faptul că, o mărire a nivelului de *superoxiddismutază* poate semnifica un răspuns al celulelor *hiperhidrice* nu numai la sporirea în ele a conţinutului în H_2O_2, ci şi la o descreştere a activităţii sau a capacităţii enzimelor implicate în descompunerea acestui peroxid, responsabile de *detoxifierea celulelor* încărcate cu un astfel de produs nociv, ce exercită o acţiune foarte dăună-

toare asupra acestora. Autorii menționați au emis și ipoteza potrivit căreia, modificările care caracterizează țesuturile și organele afectate de *hiperhidrie*, și care conduc la generarea anormalităților specifice acestei stări, se datorează acumulării în celule a unei *forme toxice* de *oxigen* ($O_2^{\bullet -}$), ele manifestând o inabilitate a structurilor vii de a anihila această formă superactivă de oxigen. Tot *Saher* și colaboratorii, au considerat că nu numai speciile de *Caryophyllaceae*, respectiv vitrogaroafele (*Dianthus caryophyllus*), sunt vulnerabile la instalarea *hiperhidriei* în țesuturi, ci că – alături de prun și de narcise – multe alte specii vitrocultivate sunt utilizate ca *modele experimentale* în studierea fenomenelor implicate într-un astfel de proces. În experimentele lor, în studierea factorilor de mediu responsabili de declanșarea *hiperhidriei*. *Saher* și colaboratorii (2004) au procedat la micropropagarea prin lăstari a trei cultivari de garoafe; autorii citați au constatat pe un mediu de bază solidificat (în cultura inițială) cu 0,8% agar; în subcultură, concentrația de agar a fost diminuată la 0,58%. După patru săptămâni de vitrocultură, această măsură a condus la instalarea *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor de garoafe, și au constatat că procentul de vitroplantule de garoafe *vitrificate* a fost dependent de natura cultivarilor. Astfel, la unele soiuri de garoafe, proporția de plante *hiperhidrice* a atins valori de 10 - 25%, în timp ce la alte soiuri procentul de incidență a acestui sindrom a fost cuprins între 70-90%. După patru săptămâni de la inocularea lăstarilor de garoafe, pe un mediu de cultură solidificat cu 0,58% agar, procesul de *hiperhidrie* a atins nivelul maxim, moment în care s-a procedat la efectuarea de determinări biochimice. În urma acestor analize s-a observat că, în țesuturile *hiperhidrice* a crescut conținutul de apă, de *Fe* (de cinci ori mai mult la cultivarul Alister, comparativ cu materialul vegetal normal) și de *K*, dar a scăzut conținutul în *P*; în schimb, în tulpinițele *hiperhidrice* a fost mult sporit conținutul în *etilenă* (la toți cei trei cultivari supuși testărilor), ca de altfel și în *malonatdialdehidă*; totodată, în țesuturile *hiperhidrice* s-a înregistrat o creștere a concentrației de H_2O_2 și a *enzimelor antioxidante* studiate (cu variații ale valorilor în funcție de cultivar), excepție făcând *lipoxigenaza*; în țesuturile *hiperhidrice* s-a înregistrat și o scădere a activității *fenilalamin-amoniu-liazei* (PAL) și o puternică creștere a *guaiacol-peroxidazei solubile*. Continuându-și aceste cercetări, *Saher* și colaboratorii (2005) au constatat că dacă a fost *răcită* partea superioară a flacoanelor de cultură – la ambele variante care au privit creșterea vitroculturilor de garoafe (pe medii de cultură solidificate cu cele două concentrații de agar-agar, respectiv 0,8% și 0,58%, cu care s-a experimentat) – în tulpinițele generate în astfel de condiții s-a înregistrat o descreștere semnificativă a procentului de plantule *hiperhidrice*, precum și o scădere a *peroxidării lipidelor*. Autorii

citați, au considerat că prin aceste experimente s-a putut dovedi – pentru prima dată, – în condițiile descrise, reducerea acumulării de H_2O_2 în celulele vitroculturilor menținute în acest regim de creştere, situație care a favorizat o *scădere* a *stresului oxidativ* în fitoinoculi.

În altă ordine de idei, *Saher* şi colaboratorii (2005) au semnalat că vitroplantulele *hiperhidrice*, în raport cu cele normale, au o cantitate redusă de *pectine*, compuşi care nu numai că intră în alcătuirea peretelui celular pectocelulozic, ci pectatul de calciu constituie „cimentul" care asigură fixarea variatelor tipuri celulare în cadrul structurilor tisulare. Materiile pectice (diferite ca natură chimică şi ca nivel de polimerizare), în pereții celulelor *hiperhidrice* suferă modificări compoziționale (probabil şi, structurale – n.n.), ceea ce explică, cel puțin în parte, slaba rezistență mecanică a pereților celulari pectocelulozici ai celulelor afectate de această „boală" fiziologică. Nu trebuie să scăpăm din vedere şi că, *pectinele* sunt implicate profund în structura pereților celulari, ele participând şi la asigurarea porozității acestora, precum şi în formarea spațiilor intercelulare, inclusiv a meaturilor, modificării care implică intervenția *litică a pectinazelor*. Totodată, materiile pectice manifestă o afinitate mare față de moleculele de apă, complex la care se asociază şi o serie de ioni. După *Saher* şi colaboratorii (2005b) în frunzulițele vitroplantulelor *hiperhidrice* de garoafe activitatea *pectin-metil-esterazei* s-a dovedit a fi de 4-10 ori mai ridicată, decât la exemplarele similare, neafectate de acest *sindrom metabolic*. Una dintre cauzele care contribuie la deformarea pereților celulelor *hiperhidrice* rezidă şi în faptul că, *gradul de esterificare al pereților* vitrofrunzulițelor *vitrificate* se află sub controlul acestei enzime (care se prezintă sub trei izoforme), în țesutul *hiperhidric pectin-metil-esteraza neutră* fiind aceea care controlează acest proces; în celulele *vitrificate* s-a evidențiat prezența izoformei acide a acestei enzime, ceea ce, în parte, explică *deformarea* pereților celulari pectocelulozici a acestor tipuri de celule, în țesuturile foliare *hiperhidrice* existând un nivel crescut de fracțiuni de pectat, dar un conținut scăzut în pectine solubile şi în protopectine. Dar, pe lângă cele menționate, subliniem că *Saher* şi colaboratorii (2002) au fost de părere şi că, în vitroplantulele *hiperhidrice* este profund afectat şi *metabolismul produşilor secundari*. Astfel, în frunzele *hiperhidrice* de mentă s-a înregistrat o scădere extrem de puternică a *sintezei de cardenolide*.

Anomaliile apărute la vitroplantulele *hiperhidrice* se petrec nu numai în organele aeriene, respectiv în tulpinițele şi în frunzulițele prezente la nivelul acestora, ci fenomenul de *vitrescență* este extins şi la *rădăcinițele* plantulelor afectate de acest sindrom, zicem noi „metabolic".

Din cele arătate se poate spune că, la plante, *hiperhidria* este un fenomen fiziologic particular, încă în mică măsură cunoscut, greu de explicat și de combătut. În natură, acest proces este mai puțin întâlnit, și a atras într-o măsură mai mică atenția fitofiziologilor. *Hiperhidria* a suscitat interesul cercetătorilor abia atunci când practicile de cultivare *in vitro* a fitoinoculilor a cauzat pierderi în industria producătoare de material de plantat, axată pe micropropagarea unor specii de interes economic, întrucât în apariția spontană, accidentală, a *vitrificării* fitoinoculilor, a devenit un factor perturbator major, împiedicând aclimatizarea exvitroplantulelor. Trebuie menționat și faptul că, uneori, *hiperhidria* se instalează doar la nivelul a o parte dintre vitroculturile vegetale, de același tip, fenomenul nefiind generalizat la toate exemplarele aflate în cultură, în flacoane învecinate. Aceste aspecte ridică, încă, multe semne de întrebare.

La vitroplantulele atinse de fenomenul de *hiperhidrie*, meristemele nu numai că-și mențin activitatea proliferativă, ci acest proces poate fi chiar intensificat, organele fitoinoculilor crescând, mai mult sau mai puțin intens, în funcție de specie și de natura inoculilor, precum și de specificul condițiilor ecofiziologice prezente în vasele de cultură; o lungă perioadă de timp, atâta vreme cât vitroplantulele *hiperhidrice* se află *in vitro*, dezvoltarea lor nu pare a fi afectată. Adeseori, față de vitroculturile normale, talia organelor aeriene afectate de *hiperhidrie* este mai mică decât aceea a tulpinițelor sau a frunzulițelor siminare, care au o aceeași „vârstă" (fig. 27 de comparat vitroplantulele de *Coleus* normale – poziția M și cele *hiperhidrice* – poziția H); alteori, în funcție de gen, de specie, ori de cultivar, sau de condițiile de mediu, talia vitroplantulelor (sau a unor organe ale acestora) poate să atingă înălțimi sau volume mai mari decât acelea constatate la omoloagele lor normale, nevitrificate (fig. 27), ele suferind chiar deformări, îngroșări, contorsionări etc. (*George*, 1996).

De reținut este faptul că, în aceleași condiții ecofiziologice, tipuri similare de fitoinoculi, vitrocultivați pe medii de cultură asemănătoare în cea mai mare parte ca și compoziție chimică, dar utilizând recipiente de forme și mărimi diferite, cu sisteme de obturare variate, pot conduce la înregistrarea unei frecvențe sporite a genezei de culturi *hiperhidrice*. Acest fenomen se acutizează dacă în mediu se operează modificări la nivelul balanței hormonale, sau crește temperatura în recipientele de căldură.

Fenomenul de *hiperhidrie* (respectiv de *vitrificare*) a incitat atenția multor cercetători din domeniul fiziologiei fitoinoculilor și a celor preocupați de citofiziologie vegetală, doritori să investigheze cauzele producerii acestui sindrom, și a consecințelor provocate de o astfel de manifestare, perseverându-se în adâncirea studiilor efectuate la nivel celular, ultrastructural

şi biochimic, analizându-se cu precădere modificările intervenite pe plan funcţional şi metabolic.

Datele obţinute în urma analizării aspectelor ultrastructurale alterate, provocate organitelor celulare ale ţesuturilor *hiperhidrice*, dar şi în urma examinării structurii ţesuturilor, organelor sau a vitroplantulelor (în întregul lor), afectate de un astfel de sindrom (care nu este cauzat de prezenţa în sistemul viu a unor germeni fitopatogeni), s-au constituit ca obiective de studiu în multe colective de biotehnologie vegetală.

În afara aspectelor menţionate în partea introductivă a acestui subcapitol, în cele ce urmează vom puncta şi vom analiza principalele cercetări efectuate pe plan mondial şi naţional, în studiile care au avut în vedere, ca principal scop, evidenţierea şi explicitarea rolului jucat de diferiţi factori exogeni şi endogeni, în declanşarea şi susţinerea instalării şi a avansării proceselor de *hiperhidrie* în fitoinoculii cultivaţi în variate condiţii experimentale.

2.2.2. POTENŢIALELE CAUZE RESPONSABILE DE PRODUCEREA *HIPERHIDRIEI* LA NIVELUL FITOINOCULILOR

În ultimele două decenii, s-a extins mult studierea fenomenului de *hiperhidrie*, instalat la nivelul fitoinoculilor. În momentul de faţă, astfel de cercetări ocupă o poziţie importantă în literatura de specialitate, de profil, cu toate că *Gautheret* – încă în anul 1977 – a semnalat şi a descris acest fenomen, la plante.

2.2.2.1. Cauzele ecofiziologice care induc şi susţin producerea *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor

2.2.2.1.1. Starea fizică a mediului de cultură şi interrelaţionarea acestui factor cu natura chimică a compuşilor prezenţi în substrat

Experimente efectuate în anii `70 (*Hauzinska*, 1974; *Davis* şi colab., 1977; *Sutter* şi *Langhans*, 1979), şi continuate în anii `80 (*Debergh*, 1983; *Hakkaart* şi *Versluijs*, 1983; *Druart* şi colab., 1984; *Kevers* şi colab., 1984; *Pâques* şi *Boxus*, 1987 b; *John*, 1986), ai secolului trecut, au arătat că reducerea cantităţii de ***agar*** din mediul de cultură, sau eliminarea totală a acestuia prin utilizarea de substituienţi gelificanţi, ori de medii de cultură *lichide*, poate determina apariţia *hiperhidriei* la nivelul vitroplantulelor de garoafe, de crizanteme, de măr, precum şi de alte specii.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Franclet (1980) afirma că, în laboratoarele care utilizează *cărbunele activ*, ca adaos la mediul agarizat de vitrocultivare a fitoinoculilor, nu sunt prezente tulburări de natură *hiperhidrică*, el adsorbind excedentul de compuși care provoacă *hiperhidria*.

Ulterior, *Debergh* și colaboratorii (1981) au adus precizări referitoare la faptul că la inoculii de *Cynaria*, prin ridicarea concentrației de *agar-agar*, în mediul de cultură, de la 0,6% la 1,1 %, *hiperhidria* – în timp – poate fi *anihilată*. Această modalitate de cultură exercită, însă, consecințe negative atât asupra intensității neogenezei de mugurași, la nivelul fitoinoculilor, cât și a creșterii lăstarilor regenerați din aceștia. La o concluzie asemănătoare a ajuns și *Orlikowska* (1985), în cazul practicilor de micropropagare a mărului și a părului, precum și *Rugini* și colaboratorii (1985), la vitroculturile de migdal, măslin, sau de alte specii vegetale. Aceștia au constatat că, prin creșterea concentrației de *agar-agar* în mediul de cultură, capacitatea *invertazică* a celulelor inoculilor devine factor limitativ al creșterii acestora. În aceeași perioadă, prin experimentele sale, *Pâques* (1985) a dovedit că pentru *prevenirea* sau *anihilarea hiperhidriei*, agar-agarul trebuie substituit cu *agar hidrolizat*, compus care conține un complex chimic ce conduce, la nivelul fitoinoculilor, la evitarea demarării instalării proceselor de *vitrificare* menținând starea de normalitate, în proliferarea și creșterea celulară și a țesuturilor vegetale, vitrocultivate. Dar, pe măsură ce se prelungește durata de vitrocultivare a fitoinoculilor, pe un astfel de mediu, concentrația acestui complex chimic descrește în substratul de cultură, el fiind absorbit preferențial de către celulele vegetale aflate în cultură, iar fenomenul de *hiperhidrie* se poate reinstala (*Pâques* și *Boxus*, 1986). Adeseori, s-a observat că transferarea inoculilor de pe medii lichide, pe medii agarizate, poate produce *eliminarea* sau *atenuarea* fenomenelor de *hiperhidrie*.

Pe de altă parte, *Pâques* (1985) și *Pâques* și *Boxus* (1987b) au dovedit că mediul proliferativ *lichid* facilitează instalarea fenomenului de *hiperhidrie*, în țesuturile fitoinoculilor. La un același tip de inocul, pe un mediu de cultură identic, adăugarea a 0,7% Difco Bacto agar a determinat doar apariția sporadică a procesului de *hiperhidrie*; prin ridicarea concentrației de *agar-agar* la 1%, *hiperhidria* s-a redus foarte mult, dar la nivelul fitoinoculilor concomitent a scăzut și proliferarea de mugurași.

Tot *Pâques*, împreună cu colaboratorii săi (1984) au constatat că, chiar și pe mediu proliferativ lichid, *hiperhidria* poate fi *preîntâmpinată*, prin eliminarea BA din compoziția acestuia.

Paolicchi și colaboratorii (2002) au constatat instalarea unei *hiperhidrii* – în proporție de 100% – la vitroplantulele de *Mentha piperita*, culti-

vate pe un substrat agarizat, care a conținut BA. Culturi similare efectuate pe medii lipsite de BA nu au prezentat fenomenul de *hiperhidrie*.

Nu se cunosc particularitățile fiziologice sau metabolice care reglează reacția variatelor specii sau genotipuri de fitoinoculi, la condițiile inductoare de *hiperhidrie*. După *Davis* și colaboratorii (1977), la *Dianthus caryophyllus*, precum și după *Hale* și colaboratorii (1992), la fitoinoculii de *Citrullus lanatus*, incidența *hiperhidriei* la culturile practicate în mediu *lichid* este foarte mare, în timp ce, la fitoinoculii de *Begonia rex* și de *Nicotiana tabacum*, în condiții ecofiziologice similare, fitoinoculii sunt neafectați de *vitrescență*.

Krueger și colaboratorii (1991), la vitroculturile de lăstari de *Amelanchier x graniflora*, au observat absența *hiperhidriei* în condițiile în care imersarea fitoinoculilor în mediul de cultură se petrece doar timp de 5 minute, operată la intervale de 30 de minute, sau chiar de 60 de minute.

În general, experimentele descrise au dovedit faptul că, o concentrație scăzută de *agar-agar*, în substratul de cultură al unor tipuri de fitoinoculi, poate induce apariția *hiperhidriei* în țesuturile acestora, în timp ce creșterea concentrației de agar în mediile respective reduce incidența și amplitudinea *vitrescenței*. Pe de altă parte, *natura agar-agarului*, utilizat pentru solidificarea substratului de cultură aseptic a fost incriminată ca fiind responsabilă de producerea și întreținerea *hiperhidriei* în țesuturile organelor vitroplantulelor (*Pasqualtto* și colab., 1986; *Cachiță*, 1987). Nu trebuie însă scăpat din vedere că, *agar-agarul* este „relativ bogat" în Na, Br și în I (*Cachiță*, 1987; *Bonga* și *Von Aderkas*, 1992; *Franck* și colab., 1997), ioni care sunt implicați într-o multitudine de procese endocelulare; de aceea, adeseori, mulți cercetători au înlocuit *agar-agarul* cu Gelritul, o gumă gelanică ce constă dintr-un complex polizaharidic natural, extras din biomasă de *Pseudomonas elodea*. Acest biomaterial, comparativ cu *agar-agarul*, conține mai puține impurități organice, și este lipsit de elemente minerale.

Dar, *Pasqualtto* (1986), *Zimmerman* (1991), *Huang* (1995) și *Franck* (1995 și 1997) au demonstrat, împreună cu colaboratorii lor, că producerea fenomenelor de *hiperhidrie* a fost semnalată chiar și în cazul utilizării *Gelritului*, ca agent gelificant. *Franck* și colaboratorii, într-o lucrare publicată în anul 1995, au demonstrat pe inoculii de prun, că *in vitro* 37% dintre tulpinițele normale – subcultivate pe mediu *Murashige-Skoog* (1962) în care *agar-agarul* (8 g/l) a fost înlocuit cu 2,5 g/l *Gelrit* – în cea de a 7-a zi de la efectuarea transferului au devenit *hiperhidrice*, pentru ca în cea de a 21-a zi de la operarea subcultivării, procentul de lăstari *vitrescenți* să se ridice la 100%. Totodată, autorii au semnalat că la nivelul acestor vitroplantule

hiperhidrice s-a înregistrat producerea de modificări în ceea ce privește activitatea unor enzime implicate în *sistemele antioxidante*.

Tot *Franck* și colaboratorii, în urma experimentelor efectuate de către ei, și publicate în anii 1998 și 2004, au ajuns la concluzia potrivit căreia lăstarii de *Prunus avium*, vitrocultivați pe mediu solidificat cu *Gelrite*, suferă un stres provocat de prezența la nivelul fitoinoculilor a unor acumulări prea mari de *etilenă*, de *poliamine* și de *prolină* (compuși considerați ca markeri ai *stresului*), care au cauzat instalarea *hiperhidriei* în țesuturi, fenomen absent la vitroculturile realizate pe mediu agarizat.

După *Herman* (1994b), *Marga* și *Morvan* au observat o prevenire a *hiperhidriei* la culturile de explante de măr, în condițiile micropropagării acestei specii într-un mediu de cultură lichid, dacă în el au fost adăugate fragmente de *agar hidrolizat*, în cantitate de 7 g/l. Continuându-și experimentele, *Marga* și colaboratorii (1997) au ajuns la concluzia că agarul hidrolizat, prezent în mediul de cultură *Murashige-Skoog* (1962), a protejat împotriva *hiperhidriei*, lăstarii de măr, cultivați în mediu *lichid*, prevenind complet *vitrificarea*, grație existenței în el a unor oligozaharide, ale căror greutate moleculară a fost cu puțin sub 2 Kda, și care conțin derivați metilați și sulfatați ai galactozei.

Smith (2006), experimentând cu vitroculturi de pin și de eucalipt, în urma cercetărilor sale a ajuns la concluzia că și alginatul de sodiu ar fi un posibil agent *antivitrificare*. Dacă la mediile de cultură a adăugat *Gelrite*, în amestec cu alginat de natriu (12% din totalul amestecului), a constatat că s-a redus semnificativ procentul de *vitrificare* înregistrat în cazul în care mediul de cultură a fost gelificat doar cu *Gelrite*, ceea ce reprezintă o soluție mai ieftină decât aceea a utilizării agarului, rezultatele fiind la fel de eficiente ca și în cazul folosirii agarului, în exclusivitate.

Danesh și colaboratorii, într-o comunicare prezentată la conferința Asociației Internaționale de Culturi de Țesuturi și Celule Vegetale, care a avut loc în Australia, în anul 1966 (după *Herman* 1997) s-au referit la faptul că, deși înainte de autoclavarea mediilor de cultură solidificate cu *agar-agar* sau cu Gerlite, li se reglează pH-ul la valori de 5,2-5,8, după sterilizare acesta scade cu o unitate, ceea ce, ulterior, induce producerea unor transformări nedorite la nivelul vitroculturilor vegetale. Însă, dacă mediile au fost solidificate cu *carragenan* (*Gelcarin*) – un produs extras din pereții algei roșii *Euchema* – fitoinoculii cultivați pe astfel de medii nu devin *hiperhidrici*; comparativ cu agenți clasici (agar-agarul sau Gelrite), utilizați pentru solidificarea mediilor de cultură, *carragenanul* are un preț de cost mai scăzut, iar mediul de cultură gelificat cu acest compus este clar, și lipsit de opalescență (*Herman*, 1997).

Alți autori, *Lima-Nishimura* și colaboratorii (2003), au fost de părere că o modificare a sistemului fizic de solidificare a mediului de cultură, în sensul gelificării substratului prin asocierea *agar-agarului* 0,4% cu un extract de *xiloglucan*, preparat din semințe de *Hymenaea courbaril*, a constituit o măsură benefică în prevenirea *vitrificării* inoculilor de *Malus*. În plus, în timp ce pe mediul clasic de cultură – gelificat exclusiv cu agar – *rizogeneza* a fost de 6,7%, în cazul mediului preparat cu adaos de xiloglucan, aceasta a fost de 66-70%.

Ivanova și colaboratorii (2006) au efectuat un studiu cu privire la interrelaționarea mai multor factori, cum ar fi a agenților gelificanți utilizați în substrat, cu aceea a *citochininelor exogene*, ansamblu care în influențează nivelul *endogen* de *citochinină*; experimentele au fost făcute pe vitroplantule de *Aloe polyphylla*, normale sau *vitrificate*. Concluzia autorilor a fost aceea că, *hiperhidria* este un *proces multifactorial* în care, categoric, tipul de agent gelificant și *citochininele* joacă un rol important, iar conținutul endogen în acești fitohormoni este influențat de natura citochininelor exogene folosite în experimentele respective, în această categorie intrând BA sau zeatina, în concentrații de 0,5 și 15 μM; pe mediile solidificate cu *Gelrite*, în plantulele *hiperhidrice* s-a produs o creștere a concentrației endogene de citochinină. Deci, la vitroplantulele de *Aloe*, citochininele exogene și *Gelritul* induc producerea *hiperhidriei*. În condiții similare, pe medii în care agentul gelificant a fost *agarul* s-a marcat o mai redusă incidență a *hiperhidriei*. *Nairn* și colaboratorii (după *Herman*, 1994b) au sugerat că efectul agarului – de prevenire a *hiperhidriei* – s-ar datora prezenței în acesta a unor *galactani sulfați*.

Culturile de țesuturi sau de explante vegetale, practicate pe, sau în, medii *lichide*, respectiv în regim submers (static sau agitat, ori barbotat cu aer, sau cu aer suplimentat cu CO_2 – în cazul vitroculturilor fotoautotrofe), sau susținute fiind pe o punte, ori pe cartuș din hârtie de filtru, sau pe un suport din poliuretan, ori din vată minerală etc., ridică unele probleme în ceea ce privește oxigenarea materialului vegetal, în funcție de natura fitoinoculilor.

Problemele de *hiperhidrie* devin acute numai în cazul practicării de vitroculturi de lăstari, ori de embrioni somatici, care în decursul cultivării lor *in vitro* germinează și dau naștere la plantule. De exemplu, *Aitken-Christie* și colaboratorii (1988) au subliniat că, vitroculturile de *Pinus radiata*, practicate în mediu lichid, în regim submers, agitat, au prezentat lăstari mult mai *vitrescenți* decât cele executate în mediu lichid, staționar.

Woodward și colaboratorii (1991) au fost de părere că, lipsa oxigenului din mediul de cultură provoacă apariția *hiperhidriei*, la nivelul

fitoinoculilor. Alți cercetători (după *George*, 1996) nu au confirmat acest punct de vedere. În cazul utilizării de medii lichide, *hiperhidria* instalată în lăstarii de *Cephalatus folliculans* a fost anihilată prin amplasarea acestora pe un suport de vată minerală „scăldată" de un același tip de mediu *lichid*, ceea ce facilitează nu numai o creștere mult mai bună a lor, și o sporire a ratei de multiplicare a acestora, ci și dobândirea unei culori de un verde-închis, în contrast cu aspectul verde-gălbui al aceleiași culturi, practicată pe mediu agarizat.

După *Kadota* și colaboratorii (2001), și *Kadota* și *Niimi* (2003), în mediul de cultură *lichid* există și cazuri în care prezența *citochininelor*, respectiv a BA, în concentrație de 1-10 mg/l, la vitroculturile de păr japonez a indus creșterea biomasei proaspete a fitoinoculilor, fără ca la nivelul acestora să se înregistreze producerea de *hiperhidrie*; dar, în cazul montării unui experiment similar, în care în mediul de cultură a fost introdus *cărbunele activ*, s-a constatat producerea unei inhibiții puternice în ceea ce privește regenerarea de lăstari axilari la nivelul tulpinițelor, descrescând acumularea de biomasă proaspătă și apariția de lăstari *hiperhidrici*, în procent de peste 30% dintre inoculi, fenomen produs atât în cazul folosirii unui mediu de cultură *lichid*, cât și în condițiile utilizării unor medii *agarizate*, cu un conținut de 0,4- 0,6% agar-agar în ele.

Interesantă este metoda de vitrocultivare a fitoinoculilor în regim aseptic, pe medii *bistratificate* (supranumite și bi-fazale sau în dublu strat). Această metodă a fost practicată și de noi (*Cachiță* și colab.) încă din anul 1981, și publicată de noi în anii 1983 și 1984. Tehnica de lucru constă în amplasarea – în zona bazală a recipientelor – a unui mediu de cultură solidificat (de regulă agarizat), după care se operează, inocularea materialului vegetal, și imediat, sau ulterior, peste fitoinoculi se aplică un strat de mediu de cultură lichid, sau chiar a unui strat de apă distilată, ori a unei soluții de zaharoză sau de glucoză; raportul dintre volumul de mediu solid și cel al supernatantului lichid se poate alege după uzanțele din laboratorul în care se utilizează o astfel de metodologie de lucru, ori după scopul urmărit.

După *Pierik* (1987), culturile în regim bi-fazal fac ca incidența *hiperhidriei* să fie mai redusă, sau *vitrificarea* să fie prevenită; în cazul în care totuși *hiperhidria* se produce, consecințele ei vor fi mult atenuate.

În anii `85-`91, au apărut o serie de lucrări care au accentuat utilitatea mediilor de cultură *bistratificate* (mediu lichid ca supernatant peste cel agarizat) în prevenirea sau chiar în *anihilarea hiperhidriei*. Astfel, *John* (1986), *Viseur* (1987) și ulterior, *Jones* și colaboratorii (1988), în urma experimentelor întreprinse de către ei, cu fitoinoculi de: *Sitka spruce*, *Pyrus communis* și o variatate de *Fragaria*, au constatat că dacă peste culturile

hiperhidrice, practicate pe medii de cultură agarizate, semisolide, s-a administrat o mică cantitate de apă distilată, vitroculturile au putut fi „vindecate" de *hiperhidrie*.

La vitroculturile de lăstari de păr (*Pyrus communis*), deosebit de sensibili la *hiperhidrie*, aceasta a putut fi anulată definitiv prin efectuarea de culturi în dublu-strat, pe un mediu de bază *Murashige-Skoog* (1962) (*Rodriguez* şi colab., 1991).

După *Gaspar* (1995), există situaţii în care *hiperhidria* generată *in vitro* poate fi *reversibilă* (dar numai la nivelul zonei meristemtice – n.n.), atunci când minibutaşii prelevaţi din apexurile unor astfel de tulpinițe (lăstari), subcultivaţi *in vitro*, într-un regim adecvat asigurării condiţiilor de redresare a defectelor lor metabolice şi fiziologice, anterior descrise, se convertesc la o stare de normalitate, din aceştia (sau din explantele apicale prelevate de la ei) regenerându-se vitroplantule sănătoase. O astfel de posibilitate a fost identificată şi de către colectivul de cercetare de la laboratorul de Biotehnologie vegetală al Universităţii din Oradea, în urma efectuării de culturi în *dublu strat*, utilizând ca supernatant *apă sărăcită* în deuteriu (ASD) (*Radoveţ* şi *Cachiţă*, 2006; *Petruş* şi *Cachiţă*, 2008a).

Piqueras şi colaboratorii (1998) au făcut o serie de experimente în care au utilizat – ca model experimental – fitoinoculi de tutun cultivaţi în regim de medii bistratificate, folosind un mediu de cultură *Murashige-Skoog* (1962), cu 2% zaharoză şi cu 1 mg/l BA. Având în vedere optimizarea condiţiilor de vitrocultură, şi prevenirea apariţiei fenomenelor de *vitrificare*, autorii citaţi au procedat la *răcirea* porţiunii de vârf a recipientelor cu fitoinoculi, ceea ce a condus la o scădere a umidităţii în vase (multiplicarea rămânând ridicată), incidenţa *hiperhidriei* diminuându-se cu 35%. Prin această metodă s-a evitat ascensiunea vaporilor de apă în zona superioară a flacoanelor de cultură. În condiţiile combinării sistemului de *răcire*, cu cel de creştere al inoculilor în regim de *mediu bistratificat*, respectiv la bază mediul agarizat (enunţat anterior), cu adaos de *cărbune activ* 0,3%, şi cu supernatant constând din soluţie nutritivă Knop ½ şi zaharoză 5%, *Piqueras* şi colaboratorii (1998) au obţinut vitroplantule de înaltă calitate; dar, la nivelul inoculilor s-a constatat o diminuare a regenerării de muguraşi adventivi, fenomen explicat, de către cercetătorii amintiţi, ca fiind datorat, probabil, adsorbirii a o parte din BA de *către cărbunele activ*.

În micropropagarea plantelor de interes agricol sau forestier, s-au intensificat şi s-au extins tehnicile de vitrocultivare a fitoinoculilor în *bioreactoare*, practici care presupun utilizarea ca substrat de cultură a mediilor *lichide*. Dar, după cum se cunoaşte (*George*, 1996), regimul de submersie, la o serie de specii vegetale, induce producerea *hiperhidriei* la nivelul aces-

tora. După *Ziv* (2005), în celulele fitoinoculilor mediul de cultură *lichid* cauzează instalarea unui *stres*, mai ales *oxidativ*, al cărui semnal acționează negativ asupra acestora, asociat fiind cu formarea și eliberarea în celule de oxigen activ și de radicali liberi, tablou general la care se adaugă producerea de schimbări în activitatea enzimelor antioxidante. Pentru a fi prevenite astfel de fenomene, fără a fi anulate avantajele condițiilor responsabile de proliferarea meristemelor și regenerarea de muguri sau de protocormi (acolo unde este cazul), *Ziv* a recomandat introducerea în mediile de cultură a unor *inhibitori de creștere*, ori a retardanților de sinteză, cum sunt *ancimidolul* sau *paclobutrazona*. În vitroculturile vegetale, acești compuși micșorează absorbția apei în celulele ce se află în stare de multiplicare, reduc vacuomul acestora, diminuează spațiile intercelulare, scad elongarea caulinară, inhibă expansiunea foliară și induc formarea de conglomerate de mugurași. Cea mai mare parte dintre fenomenele citate *previn* instalarea *hiperhidriei* în celulele, respectiv în țesuturile fitoinoculilor. Potrivit indicațiilor date de către *Ziv*, în lucrarea publicată de către aceasta, în anul 2005, procesele de propagare în bioreactor a cultivarilor de sparanghel, de țelină, sau de castraveți, ridică – în decurs de 3-4 săptămâni – de 3-6 ori producția de masă vegetală. Aceste proceduri, însă, presupun parcurgerea ciclului de micropropagare în două stadii, în care sunt implicați diferiți regulatori de creștere, în funcție de etapa de dezvoltare în care se află fitoinoculii. Din punctul de vedere al randamentului în micropropagare, vitroculturile efectuate în bioreactoare sunt mai avantajoase decât cele realizate pe substrat agarizat (respectiv solidificat), întrucât contactul între țesuturi și mediul lichid este mai eficient, și procesele de morfogeneză pot fi mai ușor controlate.

Li-Hua și colaboratorii (2005), preocupați de optimizarea condițiilor de creștere a vitroculturilor de măr, efectuate în bireactoare (o eficientă și economică cale de propagare în masă a plantelor, în condițiile în care sunt soluționate favorabil problemele „*critice*", cum ar fi *hiperhidria*), în regim de submersare a fitoinoculilor în mediu de cultură *lichid*, au ajuns la concluzia că, una dintre modalitățile prin care se poate rezolva *hiperhidria* este aceea a imersării temporare, periodică, ritmică, a inoculilor în soluția folosită ca substrat. Asemenea lui *Ziv* (2005), pentru vitrocultură ei au recomandat utilizarea a două tipuri de medii, unul pe durata fazei de multiplicare celulară, în substrat fiind prezente concentrații mari de regulatori de creștere, respectiv 4,4 μmol BA în amestec cu 0,5 μmol AIB, și un al doilea, administrat în perioada de alungire a lăstarilor, având concentații mai scăzute de BA, de numai 1,1 μmol BA și de numai 0,25 μmol AIB; dar, cu cât a fost mai mare aportul de BA în mediul de cultură, cu atât a crescut procentul de *vitrificare* a lăstarilor. Imersarea temporară a fitoinoculilor, cu o frecvență de 16 cufun-

dări/24 ore, a fost mai benefică, în raport cu practicarea unui regim de 8 cufundări de durată, pe zi.

Herman (2008), într-o sinteză a sa, a menționat că *Pereira-Netto* și colaboratorii (2007), făcând un studiu referitor la implicarea naturii agarului (proveniența acestuia, funcție de firma producătoare), în multiplicarea la *Malus prunifolia* și în apariția *hiperhidriei*, au constatat că Phytagarul, sau agarul A-7921, au provocat un înalt nivel de *vitrificare* a fitoinoculilor. Analizele au arătat că, nici rata de multiplicare, și nici incidența *hiperhidriei* nu au putut fi corelate cu gradul de soliditate, respectiv de fermitate a masei gelificate, ci cu existența probabilă a unei relații optimale între o polidispersabilitate moleculară ridicată a tipului de agar, în raport cu situația de la Phytagar, sau a altor tipuri de agar, testate.

2.2.2.1.2. Compoziția atmosferei din recipientele de cultură și incidența *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor

La fitoinoculii cultivați în incinte cu *atmosferă controlată*, în care flacoanele au avut dopuri sau folii acoperitoare, ori când obturarea recipientelor a fost realizată cu ajutorul unor membrane de fabricație specială, bistratificate (care prezintă în structura lor orificii foarte fine, care facilitează efectuarea schimburilor de gaze a atmosferei din vasele de cultură, cu mediul din afara acestora, fără infectarea vitroculturilor), riscul producerii fenomenelor de *hiperhidrie* este minim (*Cachiță*, 1987; *Cachiță* și colab., 2004).

Actualmente, dintre factorii externi care determină producerea *vitrificării* la nivelul fitoinoculilor, este unanim acceptat ca fiind: densitatea inoculilor în recipiente, mărimea și tipul vaselor de vitrocultură, modalitatea de obturare a acestora, parametrii climatici din camera de creștere etc. La cele arătate, se adaugă parametrii privind variația presiunii și a gradientului vaporilor de apă din atmosfera recipientelor cu fitoinoculi, factori care definesc raportul dintre frunze și atmosferă, al cărui dezechilibru cauzează *hiperhidrie* (*Wardle* și colab., 1983; *Ziv* și colab., 1983; *Debergh* și *Maene*, 1984; *Bötteher* și colab., 1987,1988), ș.a. Acești factori, de regulă, se află într-un raport de interrelaționare și cauzează nu numai inducerea instalării *hiperhidriei*, ci și intensitatea și dinamica acesteia (*Hakkaart* și *Versluijs*, 1983; *Debergh* și *Maene*, 1984)..

Pe de altă parte, *Martin* (1980) – în laboratoarele căruia garoafele și piersicul-migdal au fost înmulțite *in vitro*, pe cale industrială – menționa că la unele soiuri (în cazul celor două specii amintite), nu s-a constatat apariția fenomenului de *hiperhidrie*. Acest fapt l-a determinat pe autor să practice –

în laboratoarele sale – inocularea mai multor explante într-un unic recipient de cultură, respectiv câte 15-18 exemplare/flacon. Această măsură a făcut ca, la un moment dat, respectiv în timp, condițiile ecologice create în recipientul cu o prea mare densitate a fitoinoculilor să inducă producerea *hiperhidriei*.

Deși *hiperhidria* are cauze multiple, *excedentul de vapori în atmosfera* din recipientele de cultură (precum și condensarea acestora pe pereții vaselor cu fitoinoculi), mărește riscul de *vitrificare* a inoculilor, intensificând fenomenele produse cu această ocazie. Astfel, încă *Ziv* și colaboratorii (1981; 1983) au imaginat o incintă închisă, aseptică, în care recipientele cu fitoinoculi au fost menținute decopertate, în prezența unui desicant (clorură de calciu, anhidră). Într-un astfel de container, flacoanele au fost menținute timp de 6 zile, perioadă în care umiditatea relativă din recipientele de cultură a scăzut la 85%. Cu toate că în astfel de condiții procentul de vitroplantule *hiperhidrice* s-a redus substanțial, procedura nu poate fi practicată pe scară largă – mai ales pe o durată mai lungă de cultură – întrucât în recipientele decopertate se produce o puternică uscare a substratului, crăparea acestuia (fapt nedorit), în timp înregistrându-se o reducere a vitezei de creștere a fitoinoculilor.

Atunci când tulpinițele fitoinoculilor au devenit *hiperhidrice*, *ventilarea* culturilor previne formarea de noi lăstari *hiperhidrici*; lăstarii deja *vitrificați* nu mai pot fi convertiți la o stare de normalitate (*George*, 1996).

Utilizarea unor sisteme de *ventilație*, anexate unor incinte în care sunt introduse recipientele cu fitoinoculi, a fost practicată de către *Zobayed* și colaboratorii (2001a și b), la tutun, de *Lai* și colaboratorii (2004; 2005), la vitroculturile de *Scrophularia yoshimurae*, de către *Parck* și colaboratorii (2004), la cartof, dar și de *Mills* și *Tal* (2004), la tomate, ș.a.m.d. Măsura a avut efecte benefice în prevenirea *hiperhidriei*, prin reglarea echilibrului hidric, mai ales la nivelul frunzelor, respectiv al epidermei acestora.

Ventilarea vaselor de cultură se poate face prin utilizarea unui curent de aer asepsizat prin filtrare, introdus în recipiente, din afara lor, prin exercitarea unei presiuni externe, pozitive. O astfel de ventilare forțată a vaselor se face la flacoanele cu fitoinoculi de mici dimensiuni, amplasate și închise în containere mari, vasele de cultură fiind neobturate. O ventilare prea puternică poate provoca, însă, o deshidratare a mediului și o concentrare substanțială a compușilor din acesta, ceea ce duce la o inhibare a creșterii inoculilor.

O variantă mai operantă, de circulare mai rapidă a aerului în vasele de cultură închise, este aceea a obturării recipientelor cu folii care dispun de o permisivitate mărită (mai ales în anumite zone ale suprafeței acestora), în ceea ce privește efectuarea schimburilor de gaze, precum și în direcția eva-

BCU ABATORIA UNIVERSITY LIBRARY

cuării vaporilor excedentari. În această categorie se încadrează *filmele microporoase din polimetilpenten*, sau din polipropilenă (*Kozai*, 1991), ori foliile de polietilenă, microperforate (*Debergh*, 1991), sau peliculele constând din polimeri fluorocarbonați etc. (*George*, 1996). *Lakshmanan* și colaboratorii (1997) au înregistrat – în cazul micropropagării speciei lemnoase *Ixora coccinea* – o reducere a numărului de lăstari *hiperhidrici*, regenerați pe medii BA, în flacoane obturarte cu film constând dintr-un polimer de fluorocarbon, în situația în care în mediul de cultură a fost adăugată aminoetoxivinglicină (AVG) (*Herman*, 1997e).

În anumite camere de creștere, unele tipuri de recipiente de cultură, din cauză că partea superioară a tuburilor cu fitoinoculi este mai *rece* decât zona bazală a lor, se produce o condensare a vaporilor de apă din atmosfera vaselor de cultură, iar picăturile rezultate din condens alunecă pe pereții acestora, prelingându-se până la nivelul mediului agarizat. Dar, agar-agarul prezent în mediile de cultură, solidificat fiind, reabsoarbe doar o cantitate mică din apa rezultată din condens, întrucât doar *agar-agarul* încălzit (topit) deține o capacitate mare de reținere a apei. În consecință, apa colectată prin condens, la nivelul suprafeței mediului solidificat cu agar, se va reevapora, în recipientele de cultură întreținându-se astfel, în permanență (în circuit închis), o atmosferă încărcată cu vapori; în consecință, *vitrificarea* fitoinoculilor – sensibili la excedent de umiditate în atmosferă – va fi de nestăvilit, mai ales la lăstarii crescuți până în zona de vârf a vaselor, aceștia devenind repede *hiperhidrici* (*George*, 1996).

Pentru a scăpa de fenomenul de condens, *Ziv* și colaboratorii (1983; 1987) au optat pentru amplasarea flacoanelor tubulare de cultură (adeseori eprubete) pe *suporturi înclinate*, astfel încât la nivelul atmosferei din recipientele de cultură să se evite diferențele mari de temperatură și de încărcare cu apă a atmosferei, mediu agarizat fiind solidificat în eprubete – prealabil inoculării – prin menținerea lor într-o poziție înclinată. Prin această metodă, autorii citați au reușit să evite, la garoafe, în procent de 100%, instalarea *hiperhidriei* în zonele apicale ale vitrotulpinițelor, fiind *vitrificate* doar zonele bazale ale acestora, din imediata apropiere a mediului agarizat. În acest mod, în subcultură, utilizând minibutași terminali, s-au realizat vitroculturi normale.

Umiditatea atmosferică prea ridicată dăunează mai ales culturilor cu creștere încetinită, cum este cazul minibutașilor binodali, bazali, producând *hiperhidrie* la nivelul lor; în raport cu situația descrisă, la minibutașii prelevați din zona apicală a lăstarilor – care în mod obișnuit au o creștere rapidă – *hiperhidria* nu este prezentă. În consecință, vârfurile caulinare fiind rapid

crescătoare, după subcultivare rareori acestea dau lăstari *hiperhidrici* (*George*, 1996).

Ventilarea vitroculturilor pare să fie o măsură eficientă în prevenirea *hiperhidriei*, atunci când recipientele cu fitoinoculi sunt obturate cu capace în care sunt practicate orificii fine, măsură care, însă, nu trebuie să fie permanentă, ci să fie aplicată doar o anumită perioadă de timp. Astfel, *Dillen* și *Buysens* (1989), la explante constând din minibutași nodali de *Gypsophila paniculata*, au reușit să prevină apariția *hiperhidriei* la nivelul inoculilor, fără a se înregistra o diminuare a creșterii acestora, în cazul în care *ventilarea* în camera de vegetație a fost aplicată doar pe o durată maximă de 14 zile; dacă însă *ventilarea* a continuat, s-a redus considerabil creșterea fitoinoculilor, din cauza desicării mediilor de cultură și ca urmare a situației create s-a produs o mărire a concentrației compușilor existenți în substrat.

În cazul *ventilării* vitroculturilor trebuie să se aibă în vedere și aspectele care privesc pierderea de apă din țesuturile fitoinoculilor, prin evapotranspirație, în funcție de viteza fluxului de aer. După cum am menționat în partea introductivă a acestui subcapitol, la organele aeriene ale fitoinoculilor epiderma nu prezintă cuticulă sau ceară, evapotranspirația la nivelul acestora fiind foarte intensă; în plus, la vitroplantulele *hiperhidrice* aparatul stomatic este nefuncțional. În cazul vitrotulpinițelor *hiperhidrice*, situația este acutizată cu atât mai mult, cu cât acestea nu dispun de rădăcinițe, care să poată contrabalansa – prin activitatea lor absorbantă – deficitul hidric creat în masa vegetală a vitroplantulelor. După *George* (1996), o amplificare a transpirației fitoinoculilor *hiperhidrici* reduce *vitrificarea*, dar această măsură trebuie controlată îndeaproape.

Gribble și colaboratorii (1996), făcând un studiu comparativ al structurii celulelor epidermei vitrofrunzulițelor normale și a celor *hiperhidrice*, de *Gypsophila paniculata* (specie care, în unitățile de micropropagare manifestă un foarte ridicat procent de *hiperhidrie*), prin intermediul microscopului electronic cu baleiaj, de construcție specială, au constatat că stomatele frunzulițelor *hiperhidrice* se înalță deasupra nivelului suprafeței limbului foliar, iar celulele lor anexe sunt anormale și nefuncționale. Totodată, autorii citați au descoperit că, la această specie epiderma este discontinuă, ea fiind absentă pe o mare suprafață a frunzei. Mai mult decât atât, în epidermă au observat, frecvent, prezența unor orificii – mult mai largi decât osteolele stomatelor – pline cu apă, care proveneau (probabil) din apa excedentară existentă în spațiile intercelulare ale frunzulițelor *hiperhidrice*. Autorii citați au fost de părere că, incapacitatea vitroplantulelor *hiperhidrice* de *Gypsophila paniculata* de a se aclimatiza la condițiile mediului natural de viață se datorează nu numai nefuncționării stomatelor, ci și absenței epidermei pe

unele zone din suprafața frunzulițelor, astfel că vitroplantulele *hiperhidrice* nu posedă un control eficient al bilanțului lor hidric; în plus, frunzulițele având acest defect de structură ele sunt deosebit de vulnerabile la atacul unor agenți microbiologici sau la tratamente efectuate cu variate substanțe chimice (*Herman*, 1996).

Intensificarea controlată a transpirației, în regim de vitrocultură, se poate realiza (după *Maene* și *Debergh*, 1987) prin *iluminarea* puternică a culturilor, cu un flux luminos, care să aibă o intensitate cuprinsă între 10.000 și 17.000 lucși.

În recipientele suprapopulate cu fitoinoculi există pericolul ca, în timp, în substrat să se producă o dezechilibrare de *natură minerală* sau *fitohormonală* a mediului de cultură; pe de altă parte, o densitate supraoptimală a vitroplantulelor, în flacoane, poate provoca o acumulare excesivă de *etilenă*, compus gazos care induce instalarea proceselor de *hiperhidrie* în țesuturile și în celulele unor tipuri de fitoinoculi. Cu toate acestea, *Navatel* (1980) a subliniat că la căpșun, niciodată nu s-a constatat producerea fenomenului de *hiperhidrie*, chiar dacă densitatea fitoinoculilor într-un unic recipient de vitrocultură a fost mare; la alte specii, însă, el a semnalat că, chiar dacă într-un unic recipient de cultură a fost amplasat doar câte un singur explant, acesta – la scurt timp după inoculare – a devenit *hiperhidric*. *Navatel* a mai fost de părere că, plantele *vitrificate*, repicate pe un mediu de cultură lipsit de *citochinine*, uneori pot fi *recuperate*, neexistând însă certitudinea că acest transfer se va solda cu un rezultat pozitiv, în ceea ce privește anihilarea completă și eficientă a fenomenelor de *hiperhidrie*, odată declanșate. Dar, în industria de micropropagare, interpunerea oricăror operațiuni suplimentare, într-un lanț tehnologic odată stabilit, cresc costurile de producție și, în consecință, materialul de plantat astfel obținut, din punct de vedere economic poate deveni nerentabil.

Producerea *hiperhidriei*, pare a fi stimulată de *temperaturile* ridicate și de slaba iluminare a flacoanelor cu fitoinoculi, precum și de menținerea vitroculturilor, timp îndelungat, la întuneric. De exemplu, *Martinelli* (1985) a constatat – la lăstarii de piersic hibrid – o „îmbătrânire" precoce a acestora și instalarea fenomenului de *hiperhidrie* la nivelul lor, dacă ei au fost subcultivați la o temperatură de 25^0C, ceea ce nu se întâmplă dacă aceștia au fost menținuți la 20^0C. După *Stimart* (1986), lăstarii de *Aster* și cei de *Chrysanthemum*, ținuți în regim de vitrocultură, la lumină slabă (sau la întuneric), regenerează noi formațiuni caulinare care, parte dintre ele, sunt *vitrescente* și suculente.

2.2.2.1.3. Incidența *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor în funcție de natura regulatorilor de creștere prezenți în mediul de cultură și concentrația acestora

Fitohormonii, sau regulatorii de creștere (în special *citochininele* și în deosebi BA), au fost incriminați ca fiind una din cauzele majore ale producerii *hiperhidriei*, atât la fitoinoculii cultivați pe medii solide, cât și la cei crescuți în regim de submersie, în medii de cultură *lichide*, sau pe punți din hârtie de filtru.

Debergh și colaboratorii (1981), *Bornman* și *Vogelmann* (1984) și *Squires* și *Langton* (1990), au demonstrat că accesul citochininelor exogene în țesuturile vegetale este invers proporțional cu concentrația de *agar-agar* din mediul de cultură al fitoinoculilor.

Debergh și colaboratorii au semnalat, încă în anul 1981, la vitroculturile de *Cynara scolymus*, inducerea *hiperhidriei* de către *citochinine*, subiect dezvoltat ulterior, de către *Debergh* (1983) și *Miedema* (1984), în experimente în care au utilizat fitoinoculi de sfeclă de zahăr, dar și de către *Bornman* și *Vogelmann* (1984), care au cultivat *in vitro* inoculi de măr, precum și de către *Pasqualeto* și colaboratorii (1986), care au lucrat cu culturi de *Picea abies*.

Leshem (1983a), și *Leshem* și *Sachs* (1985) au fost de părere că, lăstarii *hiperhidrici* ar fi *habituați citochininic*. *Leshem* și colaboratorii (1985; 1988b) au menționat și faptul că, *hiperhidria* este cauzată de un dezechilibru hormonal intern, produs de raportul neadecvat: auxină/citochinină. Mai apoi, *Leshem* și colaboratorii (1988) au constatat că *hiperhidria* este manifestă, cu precădere, la nivelul mugurilor plantulelor vitrocultivate, ca reacție a lor la excedentul de citochinină existent în mediul de cultură.

Acțiunea benefică a concentrațiilor mărite de *agar-agar*, în mediul de cultură, poate fi explicată prin diminuarea disponibilității *citochininelor* reținute în structurile micelare ale acestui tip de substrat. Dar, după *Gaspar* și colaboratorii (1987), unele plantule devin *hiperhidrice* chiar și în absența *citochininelor* din mediul de cultură, ceea ce a condus la ideea că nu întotdeauna *citochininele* sunt inductoare ale proceselor de *hiperhidrie*, ci ele pot acționa sinergic cu alți factori.

Orlikowska (1985) considera că, la vitrotulpinițele de măr și de păr, *adenina*, respectiv *sulfatul de adenină*, sunt compușii incriminați ca fiind responsabili de provocarea instalării *hiperhidriei* în țesuturi, o scădere a incidenței *vitrificării* fiind observată doar la fitoinoculii crescuți pe medii care au prezentat un conținut ridicat în *auxine*.

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În literatura de specialitate este acceptat faptul că, *citochininele* – în funcție de natura și concentrația acestora, de administrarea lor în substratul solid sau lichid – induc *hiperhidria*, într-o măsură mai mare sau mai mică. Există o multitudine de experimente efectuate cu fitoinoculi variați ca natură, cultivați în prezența diferitelor tipuri de *citochinine*, ale căror efecte *hiperhidrice* sunt mai mult sau mai puțin asemănătoare, în funcție de complexitatea experimentelor organizate, care – de cele mai multe ori – au fost polifactoriale. Totuși, din punctul de vedere al inducerii *hiperhidriei*, dintre *citochinine*, BA este considerată ca fiind cea mai activă în producerea proceselor de *vitrificare*. Influența *citochininelor* în producerea, sau nu, a *hiperhidriei*, precum și în potențarea manifestării acestui fenomen, poate fi atenuată printr-un alt factor prezent în mediu, cum ar fi prin folosirea unui *agent gelificant* necorespunzător ca natură, sau ca și concentrație (*George*, 1996). În acest context, vom prezenta câteva experimente menite să explicite complexitatea relațiilor care se pot stabili între fitoinoculi și *citochininele* introduse în mediul de cultură al vitroculturilor vegetale. În general, concentrațiile ridicate de *citochinine*, mai ales la citochininele de tipul BA, 2-iP, zeatină și de TDZ, produc o intensă proliferare a mugurașilor, formațiuni care dau naștere la lăstari (tulpinițe) *vitrificați*, fenomen valabil atât în condițiile utilizării mediilor de cultură agarizate, cât mai ales a celor lichide; dar, ulterior, *Sandal* și colectivul său (2001) au dovedit că, la inoculii de ceai, în culturi statice practicate în mediu lichid, adaosul de TDZ – comparativ cu cel de de BA – nu a provocat *vitrificarea* lăstarilor neoformați din explantele inoculate, mai ales atunci când volumul de mediu a fost de numai 20 ml (și nu de 250 ml).

Dar *Miedema* (1984), la sfecla de zahăr a remarcat că BA – în concentrație de 10 μmol/l – în timp, în țesuturile foliare ale vitroplantulelor, declanșează instalarea proceselor de *hiperhidrie*; prin subcultivarea tulpinițelor de sfeclă, neoformate la nivelul inoculilor constând din boboci, cultivați fiind pe mediu cu adaos de AG_3 (1-10 μmol/l), fenomenul de *vitrificare* a putut fi considerabil redus, concomitent cu o stimulare a neogenezei de tulpinițe, caulogeneză care altfel ar fi rămas într-o situație staționară.

După *Franclet* (1991), vitroculturile de lăstari de *Sequoia sempervirens* au devenit *hiperhidrici* atunci când inoculii au fost cultivați pe medii cu BA; subcultivați – la intervale de o lună – alternativ, pe mediu lipsit de citochinine și cu adaos de *cărbune activ*, la nivelul acestora procesul proliferativ s-a menținut, fără ca să se mai manifeste *hiperhidria*.

Relația interactivă dintre variatele *citochinine* și *ANA*, în ceea ce privește producerea *hiperhidriei*, a fost observată la garoafe (*Beauchesne*,

1981; *Leshem* și *Sachs*, 1985), la conifere (*Dencso*, 1987) și la unele specii de pomi fructiferi (*Orlikowska*, 1987; *Gaspar*, 1991).

Ulterior, *Orlikowska* și colaboratorii (1993) au stabilit, experimental, că prin adăugarea în mediile de cultură ale inoculilor de *Carthamus tinctoria* L (culturi primare sau subculturi de embrioni imaturi), bază *Murashige-Skoog* (1962), a 0,1 mg/l TDZ, s-a reușit să se reducă nivelul de *hiperhidrie* al lăstarilor, ceea ce a permis aclimatizarea cu succes a exvitroplantulelor rezultate din aceștia. Dar, în anul 2003 *Kadota* și *Niimi*, în urma unor experimente întreprinse cu vitroculturi de *Pyrus pyrifolia N*, au ajuns la concluzia potrivit căreia TDZ-ul și CPPU[N-(2-cloro-4-piridil)-N9-fenilurea] produc mai mari daune *hiperhidrice* decât BA, sau decât *chinetina*. În schimb, *Tzitzikas* și colaboratorii (2004) au constatat că, minibutașii uninodali de mazăre, inoculați pe mediu cu TDZ, au regenerat nenumărați mugurași, aparent normali, care subcultivați fiind pe un același tip de mediu au dat naștere la o multitudine de alți mugurași, toți *hiperhidrici*.

Însă, *Tzitzikas* și colab. (2004) au dovedit că la o gamă largă de varietăți, lăstarii *hiperhidrici* de *Pisum sativum* trecuți fiind de pe medii de cultură cu AG_3, ANA și BA pe un mediu exclusiv cu adaos de 0,5% ANA, AIA sau de AIB, postaclimatizare au dat naștere la vitroplantule care au prezentat un procent ridicat de supraviețuire.

Frecvent, în vasele de cultură *închise etanș*, la nivelul fitoinoculilor s-au evidențiat alterări produse de *hiperhidrie*, perturbații fiziologice care privesc o creștere a sintezei și a emisiei de *etilenă*, în atmosfera din recipientele de cultură (*Kevers* și colab., 1984; *Kevers* și *Gaspar*, 1984; 1985a; *Hagège* și colab., 1991a și b), *etilena* făcând parte dintre fitohormonii care joacă un rol extrem de important, și complex, în desfășurarea – la plante – a o serie de procese fiziologice și biochimice, cum sunt: controlarea permeabilității membranelor plasmatice, stimularea creșterii celulare (acționând direct asupra dispunerii microfibrilelor de celuloză în peretele celular), reglarea nivelului de AIA-oxidază și a celui al peroxidazelor etc.

Kevers și *Gaspar* (1985), studiind apariția *hiperhidriei* la vitroculturile de garoafe, au ajuns la concluzia potrivit căreia mediul de cultură *lichid* determină, în mare măsură, instalarea fenomenelor de *vitrozitate* în țesuturile și în celulele aflate în regim aseptic de creștere. Din experimentele lor a rezultat și faptul că, în atmosfera din vasele de cultură, *etilena* – care în primele patru zile de la inocularea explantelor nodale în mediu lichid se acumulează în exces – induce declanșarea în țesuturile acestora a fenomenelor de *hiperhidrie*; ulterior, zi de zi, emisia de *etilenă* în vasele de cultură descrește, dar, la plantele *vitrificate*, în comparație cu producerea de *etilenă* în culturile similare executate pe medii agarizate, eliberarea de *etilenă* în

recipiente rămâne la valori superioare *vitroculturilor* efectuate în condiții de normalitate (considerate ca lot de referință, control), în raport cu martorul emisia de *etilenă* menținându-se ridicată, chiar dacă zilnic materialul biologic a fost subcultivat pe un mediu proaspăt. Cu toate acestea, introducerea de *etilenă* exogenă, în atmosfera în care explante nodale de garoafe au fost crescute pe mediu de cultură solid, nu a condus la generarea *hiperhidriei*. Autorii menționați anterior au concluzionat că, numai surplusul de *etilenă endogenă* induce *hiperhidrie*. Transferarea inoculilor de garoafe de pe mediu solid, pe un mediu de cultură lichid, a determinat producerea unei creșteri rapide a nivelului de *etilenă*, în celule, ca răspuns la stresul provocat fitoinoculilor prin schimbarea bruscă a condițiilor lor de viață.

De Proft și colaboratorii (1985), la trandafir, au observat că emanarea de *etilenă* în recipientele de cultură (determinări făcute cu gazcromatograful), în decursul variatelor etape de micropropagare, începe odată cu declanșarea creșterii fitoinoculilor; la materialul vegetal traumatizat, respectiv la explante, producția și emisia de *etilenă* – la nivelul țesuturilor secționate – a fost de circa zece ori mai mare, în raport cu cantitatea de *etilenă* eliberată, și înregistrată ca fiind prezentă în flacoanele în care plantulele au fost transferate pe medii proaspete, fără a fi lezate. La inoculii traumatizați, nivelul de *etilenă* în atmosfera din vasele de cultură a fost de 11,37 nl/h, în timp ce la fitoinoculii nelezați aceste valori au atins pragul de numai 1,7 nl/h. Autorii citați au considerat că *etilena* colectată în recipientele de cultură, posttraumă, a fost o consecință a rănirii țesuturilor, respectiv a celulelor; ulterior, treptat, producția de *etilenă* descrește, tinzând spre o stabilizare a nivelului acesteia. Într-un final, concentrația de *etilenă*, în atmosfera din recipientele de cultură, atinge valori de ordinul câtorva ppm (*De Proft* și colab., 1987).

În cazul prezenței în flacoanele de cultură a unor concentrații ridicate de *etilenă*, conținutul în clorofilă, în celulele fitoinoculilor, a fost foarte scăzut (*De Proft* și colab., 1985). Menținerea concentrației de *etilenă* în recipientele de cultură la cote coborâte, previne intrarea senescenței, la nivelul inoculilor. Pe de altă parte, autorii citați au constatat că în vitrofrunzulițele tinere conținutul în acid 1-aminociclopropan-1-carboxilic (ACC), precursor al *etilenei*, în raport cu alte părți ale vitroplantulei, a fost ridicat. Îndepărtarea frunzulițelor tinere, de la vîrful vitroplantulelor, precum și a fragmentelor traumatizate, a condus la o diminuare a producției de *etilenă* în flacoanele cu fitoinoculi, prevenindu-se astfel creșterea nivelului acesteia în vasele de cultură, concentrația ei în atmosfera din recipiente, în acest caz, situându-se la valori de 4,1 nl/h (*De Proft*, 1987). În urma acestor experimente, *De Proft* și colaboratorii au apreciat că, prin reducerea concentrației de *etilenă*

în atmosfera din recipientele de cultură se ajunge la o îmbunătățire (normalizare) a creșterii minitrandafirilor generați în regim de vitrocultură.

Leonhardt și *Kandeler* (1985; 1987), ca de altfel și alți cercetători, au fost de părere că *agar-agarul* poate fi incriminat ca fiind unul din eliberatorii de *etilenă* în substratul și în recipientele de cultură, chiar și în lipsa din acestea a materialului biologic. În astfel de condiții, adaosul de 0,3% *cărbune activ* s-a constituit într-o măsură benefică, respectiv eficientă, în adsorbirea *etilenei* emanate de către substratul agarizat, în recipientele de cultură; reproducând aceste determinări, în condițiile în care mediul de cultură a fost identic din punct de vedere compozițional, dar a fost lipsit de *agar-agar* (susținerea fitoinoculilor făcându-se pe vată minerală), în flacoane nu s-a mai înregistrat emisie de *etilenă*. În situația în care pe substrat au fost inoculate *meristeme* sau *calus*, cercetătorii au ajuns la concluzia că producerea *hiperhidriei*, și intensitatea acesteia, au fost fenomene care fără îndoială au depins de concentrația de *agar-agar* din substratul de cultură. Dar, autorii citați nu au putut elucida în ce măsură concentrația de *agar-agar*, din substrat poate fi corelată – direct proporțional – cu acumularea de *etilenă* în recipientele de cultură, și dacă creșterea concentrației de agar poate fi asociată cu descreșterea gradului de umiditate în substrat. Totodată, *Leon-hardt* și *Kandeler* au mai constatat și faptul că, efectul *etilenei* – administrată fiind din afara recipientelor de cultură – a depins de faza de diferențiere a celulelor fitoinoculilor, în sensul existenței unui anumit mod de acțiune al acesteia în decursul genezei neomeristemelor prezente la nivelul calusului, și un alt tip de influență, de altă natură, exercitată de acest compus gazos la inoculii la care *etilena* a acționat asupra meristemelor deja formate. La această concluzie autorii au ajuns și în urma constatării faptului că, la *calusurile* cu centri meristematici în formare, chiar și o concentrație redusă de *etilenă* – existentă în atmosfera din vasele de cultură, ce au o capacitate de 500 nl/l aer – în prezența cărbunelui activ a făcut ca din calus să se regenereze numai tulpinițe normale, *nehiperhidrice*; dar, în același tip de experiment, în alte cazuri, chiar și în lipsa cărbunelui activ, din calus au fost generate numai tulpinițe *nevitrificate*. Autorii nu au exclus, însă, nici ipoteza ca *etilena* să nu fi fost deloc implicată în *vitrificarea* propriu-zisă. Nu se cunoaște în ce măsură acumularea de *etilenă* în recipiente poate fi corelată, și cum anume, cu necesitatea descreșterii umidității substratului prin mărirea concentrației de *agar-agar* în mediu. S-a presupus că, prin ridicarea concentrației de *agar-agar* în mediul de cultură se produce o descreștere a *hiperhidriei*, probabil ca o consecință a legării apei din substrat de către micelele acestui polizaharid. Dar, după cum a precizat *Rugini*, împreună cu colaboratorii săi (1985), potențialul hidric al substratului nu constituie unica cauză a

hiperhidriei. După *Gaspar* şi colaboratorii săi (1989), în producerea de *etilenă*, în condiţiile micropropagării *in vitro* a trandafirului, s-a constatat că există un efect sinergic al *citochininelor*, cu cel exercitat de *auxine*.

Adăugarea în mediul de cultură a $AgNO_3$, inhibitor al biosintezei *etilenei*, atenuează vizibil simptomele de *hiperhidrie*, dar limitează creşterea mugurilor axilari (*Druat* şi colab., 1981, 1984; *Kevers* şi *Gaspar*, 1985; *Mayor* şi colab., 2003). *AboEl-Nil* şi *Al-Sabah* (după *Herman*, 1994) au fost de părere că $AgNO_3$ (în concentraţii de 1-30 mg/l) poate reduce *hiperhidria*, fără a afecta creşterea culturilor de *Rhanterium epapposum*, o plantă perenă, de deşert, din Kuwait.

Park şi colaboratorii (2004) au constatat că *etilena* este cauza instalării *hiperhidriei* la nivelul inoculilor constând din minibutaşi de cartof. În consecinţă, ei au propus utilizarea unei proceduri de înlăturare a acestui gaz prin utilizarea unui *sistem de ventilare* a vaselor de vitrocultură, în condiţiile în care mediul folosit ca substrat de cultură a fost suplimentat cu $KMnO_4$, inhibitor al sintezei de *etilenă*. Experimentul a permis şi evidenţierea faptului că, lăstarii de cartof – crescuţi în vase închise etanş – s-au aflat într-o severă stare de *hiperhidrie*, iar cei care au fost cultivaţi în recipiente ce au permis efectuarea unui eficient schimb de gaze, corespunzător cerinţelor fitoinoculilor, aceştia au prezentat o creştere normală, fără a manifesta semne de *hiperhidrie*. Analizele compoziţiei gazoase a atmosferei din recipiente, au dovedit că în cel de al doilea caz, producţia de *etilenă* în vasele de cultură a fost scăzută (*Herman*, 2004).

Kevers şi *Gaspar* (1985e) au semnalat că membranele celulare ale ţesuturilor *vitrificate*, în raport cu celulele martor, nevitrificate, au deţinut o activitate *peroxidazică* mai ridicată.

Pe lângă ionul de argint, şi alţi compuşi, cum ar fi *dinitrofenolul* (DNP), introduşi în mediul de cultură pe care au fost crescuţi inoculi nodali de garoafe, *inhibă biosinteza de etilenă*, ceea ce provoacă o reducere a *hiperhidriei*, mai ales când DNP-ul a fost folosit în concentraţie de 10^{-7} M (*Gaspar* şi *Kevers*, 1983 şi *Kevers* şi *Gaspar*, 1985).

Pe de altă parte, cobaltul – din $CoCl_2$ – presupus inhibitor al transformării ACC (precursor al *etilenei*), în *etilenă*, reglează nivelul acesteia în celule printr-o redistribuire a enzimelor endocelulare, şi nu prin exercitarea unei inhibiţii directe asupra sistemelor ACC oxidazice (*Gaspar* şi *Kevers*, 1985; *Zobayed* şi colab., 2001). Cobaltul introdus în mediul *lichid* de cultură, în care se află vitrocultivaţi inoculi de garoafe, acest element nu a avut capacitatea de a înlătura *hiperhidria*; în schimb, adăugarea de $CoCl_2$ în mediul de cultură solid, în concentraţie de 10^{-6} M – cu trei zile înaintea transferării inoculilor de pe mediu agarizat, într-un mediu lichid – a determinat o

anihilare a *vitrificării* acestora. *Gaspar* și *Kevers* (1985) au apreciat că, în acest caz, ionul de Co a anihilat o posibilă sporire a producției de *etilenă* în medii, probabil printr-o redistribuire a enzimelor endocelulare și nu printr-o inhibiție directă exercitată de acest element asupra sistemului ACC-oxidazic, respectiv a sintezei de *etilenă*. Tot în anul 1985, aceeași autori au adus precizări suplimentare, potrivit cărora prin creșterea concentrației de $CoCl_2$ în mediul de cultură, de la 0,1 μM la 1 μM, s-a prevenit instalarea *hiperhidriei* în inoculii de garoafe.

2.2.2.1.4. Importanța naturii glucidului introdus în mediul de cultură, ca substrat respirator, în prevenirea hiperhidriei la fitoinoculi

Rugini și colaboratorii (1985), experimentând pe vitroculturi de migdal și de măslin, au ajuns la concluzia potrivit căreia procesul de *hiperhidrie* nu este dependent numai de concentrația de BA din mediul de cultură, ci și de pH-ul acestuia, de *regimul de osmolaritate* existent în substrat, de lumina și de temperatura mediului ambiant, precum și de natura *sursei de carbon* glucidic din mediul de cultură și, într-o aceeași măsură, de *calitatea* și *cantitatea agar-agarului*, ca factor de gelificare al substratului.

Zaharoza și *sorbitolul* 5,1 %, la o concentrație scăzută de *agar* în mediul de cultură – corespunzătoare unei doze de 0,6% – în cultura primară determină o diminuare ușoară a *hiperhidriei*, în timp ce în subcultură, s-a remarcat o micșorare a capacității de creștere a acestor fitoinoculi.

Prezența *fructozei* în substrat (în concentrație de 4,5%) a produs o scădere a incidenței și a gradului de *hiperhidrie* la nivelul fitoinoculilor, atât în condițiile cultivării lor în regim de mediu lichid, cât și pe mediu solid. Dar, în acest ultim caz s-a observat – pe de o parte – instalarea fenomenelor de dominanță apicală (micșorându-se capacitatea inoculilor de a regenera mulți mugurași), iar – pe de altă parte – tulpinițele și frunzulițele fitoinoculilor au devenit clorotice. Dacă concentrația de *fructoză* a fost scăzută la 1,8-2,7%, procesul de *hiperhidrie* a fost în mai mică măsură anihilat; prin introducerea de *zaharoză* sau de *glucoză* în substratul cu *fructoză*, s-a realizat o mai eficientă diminuare a fenomenelor de *hiperhidrie*, aceasta fiind stabilizată la un nivel mediu, situat între stadiul atins de acest proces în condițiile utilizării unor concentrații extreme de *fructoză*, fără adăugarea în mediul de cultură a unei alte surse glucidice. De altfel, se pare că (după cum am mai avut ocazia să specificăm acest lucru în partea introductivă a capitolului de față), și în cazul fructelor sau a legumelor *vitrificate* fenomenul de sticlozitate (*hiperhidrie*) s-a datorat tot producerii unui dezechilibru glucidic în celulele pulpei unor astfel de organe, la care în anii secetoși, cu tempe-

raturi ambientale ridicate, parenchimul de rezervă este afectat de un astfel de sindrom. În astfel de situații, de exemplu la mere, se apreciază că în spațiile intercelulare ale parenchimului fructului de tip „poamă" se constată o creștere a conținutul în *sorbitol*, ceea ce induce producerea unei exosmoze, respectiv o evacuare a unei părți din apa vacuolară, și o acumulare a ei în spațiile intercelulare. La cele arătate, pot fi adăugate și experimentele efectuate pe vitroculturi vegetale, de către *Orlikowska* (1985), în urma cărora autoarea a constatat că o creștere a dozei de zaharoză în substratul de cultură conduce la o scădere a incidenței *hiperhdriei* la vitroplantulele de măr și de păr. Tot *Orlikowska* (1987) a observat și că, în cazul folosirii în mediile de cultură a unor concentrații ridicate de *fructoză*, de 8-9%, fără contrabalansarea ei cu altă sursă glucidică, la nivelul vitroplantulelor de *Carthamus tinctorius* s-a produs o instalare a fenomenului de *hiperhidrie*. La constatări asemănătoare a ajuns și *Rugini* și colaboratorii (1987), în cazul vitroculturilor efectuate cu fitoinoculi de migdal și de măslin.

După cum arătau *Pâques* și *Boxus* (1986), fenomenul de *hiperhidrie*, uneori, poate atinge proporții considerabile, fitoinoculii fiind *vitrificați* în procent de 50% și chiar de 60% (*Pâques*, 1991). Aceasta face ca, în unitățile de producere a materialului de plantat, prin tehnici de micropropagare, să se recomande examinarea și trierea periodică a vitroculturilor, și înlăturarea flacoanelor cu plante *vitroase*, întrucât culturile respective sunt compromise, fiind nevalorificabile, mai ales în cazul unor soiuri de: garoafe, măr, conifere, sfeclă, ș.a.m.d.

Marino și colaboratorii (1991), în urma experimentelor efectuate de către ei cu vitroculturi de lăstari de *Prunus armeniaca*, au ajuns la concluzia că tulpinițele cresc mai bine pe medii suplimentate cu *sorbitol*, pe lângă zaharoză și 8,8 μM BA; dar, în astfel de condiții lăstarii devin *hiperhidrici*. Pentru prevenirea *hiperhidriei*, în acest caz, autorii au recomandat introducerea în mediul de cultură – ca sursă glucidică – exclusiv a *sorbitolului*.

Un caz particular de *hiperhidrie* a fost descris la *calusul* de *Dianthus*, inițiat din petale vitrocultivate pe un mediu în care concentrația de *zaharoza* a fost mărită la 60 g/l, în mediu adăugându-se și 1 g/l hidrolizat de cazeină; temperatura în camera de creștere a fost de 30^0C. Într-o astfel de situație, s-a înregistrat o maximă regenerare de lăstari, *hiperhidria* acestora fiind, însă, puternică. Reducându-se la jumătate atât concentrația de zaharoză, cât și cea de hidrolizat de cazeină, și coborând temperatura la 15-20^0C, proliferarea de mugurași a fost menținută ridicată, iar cazurile de *hiperhidrie* au fost mult mai rare (*Frey* și *Janick*, 1991).

Tot în categoria experimentelor cu un grad ridicat de particularitate se înscriu și tratamentele aplicate explantelor de conopidă, timp de 24 ore,

cu o soluție de *zaharoză* 2M, prealabil inoculării lor *in vitro*, pe un mediu *Murashige-Skoog* (1962) agarizat, suplimentat cu 0,5 µmol/l ANA și cu 5 µmol/l BA. Pretratarea *osmotică* a explantelor cu soluție de *zaharoză*, prealabil inoculării acestora *in vitro*, a prevenit apariția *hiperhidriei* la nivelul lăstarilor regenerați din *calus* (*Vandemoortele* și colab., 2001). Aceste cercetări reprezintă o continuare a studiilor efectuate anterior de către *Vandemoortele* – în anul 1999 – pe conopidă, constând într-un același tip de pretratare a explantelor cu soluție de *zaharoză* 2M, după care regenerarea de plantule s-a făcut pe mediu de cultură lipsit de regulatori de creștere. O astfel de organizare a culturilor a favorizat neoformarea, din inoculi, de tulpinițe lipsite de *hiperhidrie*, ce au putut să fie înrădăcinate în seră, în acest mod surmontându-se – cu succes – stresul de aclimatizare a acestora la viața în mediul natural.

Pentru evitarea instalării *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor, *Ziv* și colaboratorii (1981; 1983) au fost de părere că este oportună adăugarea a 3 până la 8% *zaharoză*, în mediul de cultură gelificat cu 1% *agar-agar*, ceea ce duce la obținerea unui efect asemănător cu cel înregistrat în cazul creșterii concentrației de *agar* în substrat, măsură care produce, însă, o descreștere substanțială a capacității de multiplicare a acestora (n.n.).

Ulterior, în anul 1988, *Langford* și *Wainwright* – experimentând cu fitoinoculi constând din lăstari de trandafir – au dovedit că incidența *vitrificării* la nivelul acestora a fost accidentală, dacă concentrația de *zaharoză* din mediul de cultură a fost de 40 g/l; dar, pe măsură ce a descrescut concentrației de *zaharoză* din mediul *Murashige-Skoog* (1962), a sporit frecvența *hiperhidriei*.

În ceea ce privește incidența *hiperhidriei* la vitroculturile vegetale practicate pe mediu solidificat, un an mai târziu – 1989 – *Zimmerman* și *Cobb*, la lăstari de *Petunia hybrida*, vitrocultivați tot pe mediu *Murashige-Skoog* (1962) gelificat nu cu *agar-agar*, ci cu *Gelrite*, administrat în concentrație de 1 g/l, au obținut rezultate diferite de cele expuse anterior, întrucât în prezența în substrat a 30 g/l *zaharoză*, 80% dintre lăstari au fost *hiperhidrici*; crescând concentrația de *Gelrite* la 3 g/l, și scăzând *zaharoza* la 15 g/l, *vitrificarea* lăstarilor a fost de doar 10%. Deci, concluzia autorilor a fost că, în realția *zaharoză* și incidență *hiperhidrie*, un rol important îl joacă natura și concentrația agentului gelificant prezent în substrat.

Pe de altă parte, *George* (1996) – în monografia sa – specifica că, o concentrație *crescândă* de *zaharoză*, în mediul *Murashige-Skoog* (1962), de la 3 la 8%, reduce umiditatea relativă din vasele de cultură de la 99,6 la 99,2%.

Taji şi *Yuehua* (după *Herman*, 1994a) au adus dovezi potrivit cărora, la vitroplantulele de trandafir, un adaos de 120 mM *zaharoză*, *glucoză* sau fructoză, în mediile de cultură, îmbunătăţeşte *rizogeneza*, în raport cu numărul de rădăcini regenerate în prezenţa a 6, ori a 60 mM *zaharoză*, fapt care a facilitat, în decurs de aproximativ două săptămâni, aclimatizarea cu succes – în procent de 100% - a exvitroplantulelor.

2.2.2.1.5. Alţi factori externi care pot determina instalarea *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor

O potenţială cauză a producerii *hiperhidriei* ar putea fi şi consecinţele acţiunii negative exercitată de *agentul chimic* utilizat în scopul asepsizării suprafeţei materialului biologic care serveşte ca sursă de fitoinoculi, dar şi ca urmare a prelungirii peste anumite limite a duratei lui de contact cu ţesuturile vegetale (*Pierik*, 1987), cum ar fi a stresului provocat de *clor*, în tratamentele efectuate cu soluţii de *hipoclorit* (*Alderson* şi colab., 1987). Aceste aspecte au fost surprinse în condiţiile în care a fost comparată reacţia *in vitro* a explantelor de acelaşi tip şi specie, recoltate din teren sau de la plante crescute în seră (ce au necesitat o durată mai lungă de menţinere a materialului vegetal în lichidul dezinfectant, pentru a putea fi asepsizate corect), cu cele care s-au dezvoltat în regim acoperit, sau cu cele ce au provenit din vitrocultură, prin germinarea în regim aseptic a seminţelor. Astfel, fitoinoculii care au provenit din lăstarii ţinuţi timp mai îndelungat în mediu asepsizant (de exemplu la *Prunus tenella*), au regenerat mai multe tulpinişe *hiperhidrice*.

În altă ordine de idei, *Beauchesne* a semnalat, încă în anul1981, faptul că *in vitro*, *hiperhidria* se instalează la fitoinoculii cultivaţi pe mediu *Murashige-Skoog* (1962) complet, deoarece acest mediu posedă o concentraţie mult prea mare de NH_4NO_3. Pe de altă parte, după *Installé* şi colaboratorii (1985) *inducerea* stării de *hiperhidrie* a fost semnalată la fitoinoculii crescuţi pe medii de cultură cu o „forţă ionică" ridicată, ea fiind practic inexistentă pe medii cu o „forţă ionică" scăzută, cum sunt mediile: *Gautheret*, *White*, *Heller* sau *Knop*.

Kevers şi colaboratorii (1984) au precizat şi că, un stres – de exemplu cauzat de excedentul de *citochinine* în mediul de cultură, sau al ionilor de NH_4^+ – poate provoca o creştere a activităţii *peroxidazelor* prezente la nivelul pereţilor celulari, printr-o rapidă modificare a conţinutului în *fenoli*, în celulele ţesuturilor *hiperhidrice*. Totodată, autorii citaţi au specificat şi că, probabil, *hiperhidria* la garoafele vitrocultivate ar fi un rezultat al produceri

bruște de *etilenă* în celule, proces controlat de către sistemul peroxidazic, interferat și reglat de AIA-oxidaza.

Tot *Beauchense* (1981) a arătat, în urma experimentelor efectuate de către el cu lăstării de *Salix babylonica*, vitrocultivați pe mediu *Murashige-Skoog* (1962), că aceștia devin *hiperhidrici*, și au mai puține fascicule vasculare; după operarea unei subculturi, pe un același tip de mediu, acești fitoinoculi mor. Dimpotrivă, lăstarii de salcie, cultivați pe un mediu similar MS 1/3, vor dobândi mai mult xilem în vase, și vor supraviețui. Acest comportament al fitoinoculilor de *Salix* se explică prin aceea că, mediul *Murashige-Skoog* (1962), diluat la 1/3, conține numai ½ din cantitatea de azotat specificată în rețeta originală, în timp ce doza de $CaCl_2$ și de $MgSO_4$ a fost dublată. Astfel, concentrația ionică atât de NO_3^-, cât și de NH_4^+ a fost redusă efectiv, raportul NO_3^-/NH_4^+ în substratul de cultură rămânând același; culturile de salcie practicate în recipiente cu 40 ml de mediu de cultură, solidificat cu 0,7% Difco Bacto agar și acoperite cu câte 10 ml mediu de cultură lichid, ambele componente ce alcătuiesc cultura în *dublu-strat* având 6,7 μM BA, era de așteptat ca mediul lichid să inducă o creștere a *hiperhidriei*;,dimpotrivă, lăstarii afalți cu partea superioară a mediului lichid au crescut viguros, probabil datorită asigurării la nivelul acestora a unei absorbții îmbunătățite, optimale, a nutrienților și a regulatorilor de creștere prezenți în supernatant.

La un alt punct de vedere, împărtășit de către *Vieitez* și colaboratorii (1985), de *Letouze* și *Daguin* (1983; 1985), de *Daguin* și *Letouze* (1985) și de către *Gaspar* (1991), s-a ajuns în urma efectuării unor experimente, în principal executate cu vitroculturi de castan și de salcie, potrivit cărora ionii de NH_4^+ joacă un rol important în producerea *hiperhidriei*. Ei au considerat că, mediul de cultură *Murashige-Skoog* (1962), ca atare sau diluat la jumătate, fiind bogat în ioni de NH_4^+, poate cauza apariția fenomenelor de *hiperhidrie*, în timp ce mediul *Heller* (1963) – cu sau fără $(NH_4)_2S0_4$ – ar preveni instalarea proceselor de *vitrificare* în celulele fitoinoculilor. Autorii citați au fost de părere și că ionul NH_4^+ se acumulează excedentar în mediul de cultură, atunci când acesta a fost administrat sub formă de azotat, întrucât – dintre cei doi ioni cu azot, care compun sarea NH_4NO_3 – anionul NO_3^- este absorbit preferențial (selectiv) de către celulele unor fitoinoculi, în timp ce cationul NH_4^+ rămâne în substrat necontracarat, fapt care conduce la o dezechilibrare a raportului ionic în mediul de cultură, provocând la nivelul celulelor și al țesuturilor vitrocultivate, inducerea instalării proceselor de *hiperhidrie*. În urma experimentelor efectuate de către *Daguin* și *Letouze* (1985), aceștia au ajuns la concluzia potrivit căreia în inoculii de: *Salix*; *Prunus, Actinidia, Ceanothus,* și la *Gypsophila,* în regim de vitrocultură se

instalează o relație de directă proporționalitate între apariția *hiperhidriei* și creșterea conținutului în NH_4^+ în substratul de cultură. Deci, prin sporirea concentrației de NH_4^+ în mediul de cultură, la vitroplantulele de *Salix babylonica* a fost indusă *hiperhidria* (*Letouzé* și *Daguin*, 1983; *Daguin* și *Letouzé*, 1986), măsura respectivă exercitând efecte similare și la alte specii vegetale, vitrocultivate (*Vieitez* și colab., 1985; *Daguin* și *Letouzé*, 1986; *Phan* și *Hegedus*, 1986; *Gaspar*, 1991). Se pare că azotul de natură organică nu poate substitui, în mediile de cultură care cauzează producerea *hiperhidriei*, sarea de NH_4NO_3 (*Davis* și colab., 1977). Pe de altă parte, absorbția crescută de NH_4^+ ar conduce la un consum ridicat de zaharoză, ceea ce ar justifica existența unui deficit de glucoză în structurarea pereților celulari, și ar conduce la o dezechilibrare a sintezei de celuloză în membranele pectocelulozice (*Beauchense*, 1981; *Gaspar* și colab., 1987; *Gaspar*, 1991).

Încă în anul 1984, *Kevers* și colaboratorii, și ulterior *Ziv* și colaboratorii (1987), în urma efectuării unor experimente cu fitoinoculi de salcie și de garoafe, au raportat reușita lor în obținerea de plante normale, *nehiperhidrice*, pe mediu de cultură *Murashige-Skoog* (1962), atunci când din rețeta de macroelemente a fost omis ionul NH_4^+. Într-o lucrare publicată de către *Daguin* și *Letouzé*, în anul 1985, se specifica că mărind concentrația ionilor de NH_4^+, în mediul *Murashige-Skoog* (1962), la nivel fitoinoculilor se produce nu numai o amplificare a *hiperhidriei*,ci acest fenomen este însoțit de o hipolignificare a celulelor care au în programul lor genetic un astfel de tip de diferențiere a peretelui celular, pectocelulozic.

Alți autori, cum ar fi *Le Dily* și colaboratorii (1993), au sugerat că deficitul de structură a pereților celulari ai țesuturilor *hiperhidrice*, s-ar datora absorbției necontrolate a ionilor NH_4^+, din mediul de cultură, ceea ce ar duce la o dezechilibrare a acumulării altor elemente chimice din substrat, cum ar fi a fierului (Fe) și a fosforului (P), descrescând – în schimb – nivelul de potasiu (K).

După *Ziv* și *Ariel* (1992) o creștere normală a tulpinițelor de garoafe se produce atunci când în mediul *Murashige-Skoog* (1962) se micșorează concentrația de ioni NH_4^+, de la 20,6 mM la 10,3 mM, sau se elimină o parte din de NH_4NO_3, până la pragul de 6 mM NH_4^+.

Tot pe vitroculturi de garoafe a experimentat și *Tsay* (după *Herman*, 1997d). În investigațiile sale, el a urmărit efectele diferiților compuși care au existat în substrat în ceea ce privește incidența *hiperhidriei* atât în cultura inițială (primară), cât și în mai multe generații de subcultură. Autorul a ajuns la concluzia că, mediul solidificat cu *Gelrite* generează mai multe exemplare de vitroplantule *hiperhidrice*, decât substratul solidificat cu Difco Bacto agar, iar mediile cu BA au furnizat mult mai multe vitroculturi *hiperhidrice*,

decât cele care au avut ca citochinină chinetina; un raport NO^{3-}/NH^{4+} coborât a produs un procent mai ridicat de *hiperhidrie*, decât în cazul existenței în mediu a unui raport crescut al acestei balanțe. Astfel, pe un mediu de cultură *Murashige-Skoog* (1962) 1/2, cu 3% zaharoză și 0,9% agar, plus 0,5 ppm BA, și un raport de 1:2 a NO^{3-}/NH^{4+} s-a marcat existența unui număr minim de vitroplantule *hiperhidrice*, situație care s-a menținut mai ales în condițiile în care nu au fost operate prea multe subcultivări; în comparație cu vitroculturile primare și efectuarea primelor subculturi, explantele caulinare, apicale, prelevate de la o a patra generație de subcultivare a fitoinoculilor, aceștia au prezentat mai multe exemplare *hiperhidrice*, decât în cazul în care s-a efectuat o unică repicare.

2.2.2.2. Factorul genetic

Kevers și colaboratorii (1984), experimentând cu explante de *Dianthus caryophyllus, Saintpaulia ionantha, Fuchsia hybrida, Streptocarpus hybridus, Primula obconica, Asparagus officinalis*, precum și cu fitoinoculi prelevați de la diferiți cultivari de *Prunus* și *Malus*, vitrocultivați în condiții variate de mediu, au ajuns la concluzia potrivit căreia **factorul genetic** reprezintă o componentă decisivă în producerea, sau nu, a *hiperhidriei*, la nivelul fitoinoculilor. De altfel, și cercetările efectuate de către noi, cu garoafe (*Cachiță* și colab., 1985-1986), ne-au condus la concluzia că procesele *hiperhidrice* apărute la nivelul fitoinoculilor de *Dianthus caryophyllus* L. (cultivați în condiții ecofiziologice identice, normale, aparținând la 5 soiuri diferite), au manifestat (sau nu) o *vitrificare*, de intensitate variată, în funcție de genotip, fapt confirmat ulterior, tot la garoafe, de către *Fal* și colaboratorii (1999). La acest punct de vedere au aderat și cercetători ca *Delarue* și colaboratorii (1997), și *Beruto* și colaboratorii (2004), care și ei au considerat că *hiperhidria* este un fenomen controlat *genetic*.

Experimente efectuate de către *Delarue*, cu colaboratorii săi (1997), pe vitroculturi de *Arabidopsis mutans*, au permis identificarea și izolarea genei recesive *cri 1*, care s-a dovedit a fi responsabilă de „modificările anormale, reminiscente", caracteristice simptomelor de *hiperhidrie*.

După *Ochatt* și colaboratorii (2002), secvențe anormale de ADN se fac responsabile de producerea *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor, proces care afectează puternic negativ capacitatea rizogenă a acestora. Aceștia, experimentând pe explante prelevate de la hipocotile de *Lathyrus sativus*, provenite de la trei genotipuri variate, au ajuns la concluzia că regenerarea de mugurași, și numărul lor per un fragment, a depins de genotip. Dar, capacitatea regenerativă scăzută a fost corelată cu apariția *hiperhidriei*, iar deter-

minările citometrice de ADN nuclear au evidențiat – la genotipurile care au manifestat această reacție – o alterare a acestuia, anomalie asociată cu nivelul endogen de *auxină* și cu raportul auxină/citochinină prezent în mediul de cultură, echilibru în care concentrația de *citochinină* a părut de o mai mică importanță (după *Herman*, 2003).

Din cercetările făcute de *Ziv* (1986), de către *Gaspar* și colaboratorii (1987), de *Debergh* (1987) și de *Debergh* și colaboratorii (1992), precum și de către *Vandemoortele* și colaboratorii (1999), a reieșit că în instalarea dezechilibrelor morfofiziologice intervenite la nivelul vitroplantulelor afectate de *hiperhidrie*, contează foarte mult și **interacționarea** *mai multor factori ecologici* prezenți în mediul ambiant al vitroculturilor, cum ar fi, de exemplu, apariția unor disfuncții provocate de intercorelarea dezavantajoasă a unor nutrienți minerali, cu carbohidrații existenți în substratul de cultură, în prezența unui anumit nivel al fitohormonilor din celulele aflate în vitrocultură, sau cel al regulatorilor de creștere, de natura diferită, din substrat, procese desfășurate în condițiile în care fitoinoculii se aflau expuși la o intensitate luminoasă scăzută și la o umiditate relativ crescută (atât în atmosferă, cât și în mediul de cultură) etc.

Regimul de cultură stresant, pe parcursul perioadei de vitrocultură (de exemplu, la specii sau subculturi de *Rosaceae*, *Labiatae*, dar și la genurile *Beta*, *Forsythia*, *Asparagus*, *Coleus*, *Petunia*, precum și la alte genuri de plante – n.n.) este perceput diferențiat de către structurile vii ale diferitelor specii vegetale, unele fiind deosebit de sensibile la prezența în mediul lor de cultură a unui conținut ridicat în *citochinine* (în special a BA), dar și la producerea în substrat a unui *dezechilibru ionic* (în deosebi în ceea ce privește nivelul de NH_4^+), precum și a *excedentului de umiditate* în atmosfera din recipientele de cultură, ori a existenței *apei „nelegate"*, în mediul de cultură solidificat, ansamblu de fenomene ale căror efecte *hiperhidrice* sunt potențate, adeseori, și de acumularea de *etilenă* în atmosfera din vasele de cultură.

După *Kevers* și colaboratorii (1984; 1999), precum și după *Ziv* (1991), *ansamblul factorilor* prezenți în recipientele de cultură face ca, unii dintre aceștia să acționeze simultan, potențându-se reciproc. Acest ansamblu ecofiziologic, odată alterat, el perturbă grav echilibrul fiziologic la nivelul fitoinoculilor, declanșând instalarea stării de *hiperhidrie* în celulele care până atunci au beneficiat de un statut de normalitate morfofuncțională (*Franck* și colab., 1997). Continuându-și cercetările, *Franck* și colaboratorii, în anul 2004 au publicat opiniile lor cu privire la înregistrarea unei cantități sporite de glutationperoxidază, în vitrolăstarii *hiperhidrici* de *Prunus avium*, ceea ce semnifică o creștere a nivelului de H_2O_2 în celulele afectate de acest sindrom, enzima menționată fiind implicată în descompunerea acestui peroxid,

ea având rolul de anihilare a situațiilor de stres, generată într-o astfel de stare de disfuncție celulară.

În legătură cu disfuncțiile de natură variată, care se pot identifica la nivelul virtroplantulelor *hiperhidrice*, în cele ce urmează vom prezenta unele aspecte particulare pe care le-am surprins în cadrul unor experimente efectuate de către noi (*Cachiță* – date nepublicate), utilizând instalațiile de electronografie ale Centrului de Acupunctură din București.

Electronografia este o tehnică de investigare care se bazează pe captarea amprentelor emisiei electroluminiscente a unui obiect investigat (în cazul nostru a vitroplantulelor de garoafe, normale sau *hiperhidrice*), pe un suport fotosensibil, sau a diverselor radiații eliberate de acesta, pe captatori sensibili la domeniul emisiilor produse de materialul biologic cu care s-a experimentat.

In explorările electronografice ale organismelor vii nu sunt încă elucidate mecanismele formării imaginilor, pe un substrat, respectiv suport fotosensibil, ceea ce îngreunează interpretarea acestora. Inițial au fost acceptate teoriile referitoare la descărcările electrice produse în gaze, care aveau în vedere manifestări cu referire la sisteme fizice, abiotice. Astfel de manifestări au fost extrapolate greșit la sistemele biologice, care sunt deținătoare ale unor proprietăți calitativ diferite de corpurile lipsite de viață.

Organismele vii emit radiații în domeniul radiofrecvențelor, în infraroșu (IR), în UV, în spectrul vizibil, și în sfera radiațiilor gamma. Sub acțiunea curentului electric de înaltă tensiune (IT) se apreciază că viețuitoarele produc și o emisie în domeniul razelor X. Deci, un impuls electric, de înaltă tensiune, administrat prin electrozii aparatelor care sunt concepute să realizeze electronografia, produc și radiații în domeniul spectrului vizibil, ultraviolet (UV) și X, capabile să sensibilizeze emulsia de pe suportul fotografic, ponderea cea mai mare părând să o aibă emisiile din domeniul razelor X. Există indicații (după *Dumitrescu* și colab., 1979; *Guja*, 2000), că răspunsul structurilor biologice (a țesuturilor) în domeniul radiofrecvenței, la frecvențe diferite, variază la țesuturile normale, față de cele bolnave sau neoformate. Componentele IR și gamma nu sunt surprinse pe filmele de tip foto sau Röntgen.

Un factor foarte important, în emisiile de electroluminiscență, este acela al naturii mediului din imediata apropiere a obiectului examinat. La nivelul organismelor vii, sub impulsul descărcărilor sunt generate modificări care sunt – în mare măsură – responsabile de producerea *amprentelor electronografice*. Între acestea, constanta dielectrică joacă un rol important. Aceste mecanisme se traduc prin ionizarea gazelor, datorită producerii unor emisii reci de electroni, generate în cursul impulsului de *înaltă tensiune*

(IT), administrat în regim de înaltă frecvență (IF), transpuse în scântei, care se distribuie la periferia organismului supus examinării, imagini vizibile pe filmul Röntgen, bordând conturul anatomic al subiectului şi formând ceea ce se denumeşte „aură", sau efect „corona", descărcarea având loc între doi electrozi. Atunci când evoluția descărcării începe la electrodul pozitiv, fasciculele strălucitoare care conturează corpul organismului sunt puternic strălucitoare, şi se numesc *strimeri*; când evoluția descărcării, în scânteie, începe de la electrodul negativ, fasciculele luminoase care conturează obiectul supus electronografiei sunt mai mici şi mai difuze (*Guja*, 2000).

În urma aplicării impulsului IT, structurile supuse investigației electronografice devin sediul unor procese fizice a căror consecință directă constă în ionizarea spațiului periproximal, ceea ce se traduce prin apariția unei luminiscențe în domeniul vizibil şi UV, şi a unor radiații X. Dacă, între organismul investigat şi ecranul dielectric al aparatului se interpune un film fotosensibil, acesta este supus unor procese fizico-chimice ce au drept consecință producerea amprentei electronografice a subiectului investigat, ele reprezentând ariile de proiecție electromorfă ale obiectului supus examinării.

Amprenta electronografică este dependentă nu numai de subiectul supus experimentării, ci şi de tehnicile utilizate şi caracteristicile aparaturii utilizate. Astfel, când amprenta electronografică reflectă predominant procesele desfăşurate la suprafața structurilor investigate se realizează efectul *Kirlian*. Metoda lui *Kirlian* se referă la obținerea de fotografii ale obiectelor prin acțiunea curentului de înaltă frecvență (IF) (*Kirlian* şi colab., 1961; 1973). În cazul electronografierii organismelor vii pe placa fotosensibilă se captează şi se proiectează procesele desfăşurate în profunzimea organismelor.

Amprentarea electronografică s-a practicat şi se practică atât la obiecte, cât şi la organismele vii, la oameni, animale şi la plante. La Centrul de Acupunctură din Bucureşti, electronografia corpului pacienților a servit la identificarea meridianelor şi a organelor bolnave, indiciile obținute pe această cale ajutând la depistarea zonelor care trebuie tratate prin acupunctură. Extinderea unor astfel de proceduri ca tehnică de investigație, utilizată în diagnosticarea unor maladii umane, ne-a determinat să examinăm, comparativ, aspectul electronografic al tulpinițelor provenite de la plantule normale şi a celor *hiperhidrice*, regenerate *in vitro* din meristeme apicale, caulinare (*Cachiță* – date nepublicate).

Analizarea imaginilor electronografice, rezultate în urma expunerii tulpinițelor provenite de la vitroplantulele de garoafe *normale* sau de la cele *hiperhidrice* s-a făcut după scoaterea lor din recipientele de cultură şi după

îndepărtarea rădăcinițelor și a mediului agarizat, în care acestea au crescut. Apoi, tulpinițele au fost amplasate pe suprafața dispozitivului aparatului peste ele aplicându-se filmul Röntgen; alternativ, baza fiecărei tulpinițe a fost conectată la electrozi, fie la cei pozitivi, fie la negativi, aplicându-se la baza lor o tensiune de 25 KV; aspectele constatate au fost următoarele: – între tulpinițele vitroplantulelor normale se înregistrează descărcări electrice vizibile pe filmul pe care s-a înregistrat electronografia (fig. 45A) – în cazul tulpinițelor vitroplantulelor *hiperhidrice* astfel de descărcări au fost foarte „anemice" (fig. 45B), cu toate că fiind vorba de o *hiperhidrie*, s-ar putea considera că, gradul de umidificare al atmosferei între plăci, și între cele trei tulpinițe, să fi fost mai mare decât la tulpinițele normale, ceea ce ar fi trebuit să amplifice conductibilitatea electrică a aerului, iar descărcările rezultate să crească în intensitate și să fie mai pregnante. Probabil că, vitrotulpinițele *hiperhidrice* deși au o talie apropiată de aceea a vitroplantulelor normale, acestea să dețină un câmp *bioelectric* (*bioenergetic*) mult mai redus decât cel al vitroplantulelor normale.

2.3. POSIBILITĂȚI DE PREVENIRE SAU DE REMEDIERE A STĂRII DE *HIPERHIDRIE*, LA FITOINOCULI

Vitroculturile *hiperhidrice* de *Prunus* și de *Rhododendron*, uneori au putut fi salvate dacă – menținând integritatea lăstărașilor *hiperhidrici* – aceștia au fost subcultivați pe medii lipsite de regulatori de creștere, deoarece celulele tulpinițelor *vitroase*, de cele mai multe ori afectate fiind și de *habituație*, devin autonome fitohormonal (cel puțin unele dintre ele), prezența regulatorilor de creștere în substratul de cultură devenind excedentară și supraoptimală (*Franck* și colab., 2004).

De altfel, după cum au arătat *Von Arnold* și *Ericksson* (1984), *John* (1986), *Bötteher* și colaboratorii (1988) și *Gaspar* (1991), procesul de *hiperhidrie* poate fi, uneori, reversibil. Astfel, la plantele *hiperhidrice*, frunzulițele nou formate, după subcultivarea tot *in vitro* a plantulelor, pe un mediu proaspăt (sau chiar după transferarea lor în seră), adeseori asistăm la o revenire a acestora la starea de normalitate.

Din cele prezentate a rezultat că, procedurile recomandate în literatura de specialitate pentru *prevenirea* producerii *hiperhidriei* la nivelul fitoinoculilor, sau de înlăturare a stării de *vitrificare* – după ce aceasta a devenit manifestă – sunt mai mult sau mai puțin eficiente, nefiind radicale și neavând un caracter de generalitate, ele neconducând la rezultate benefice în cazul tuturor tipurilor de vitroculturi vegetale.

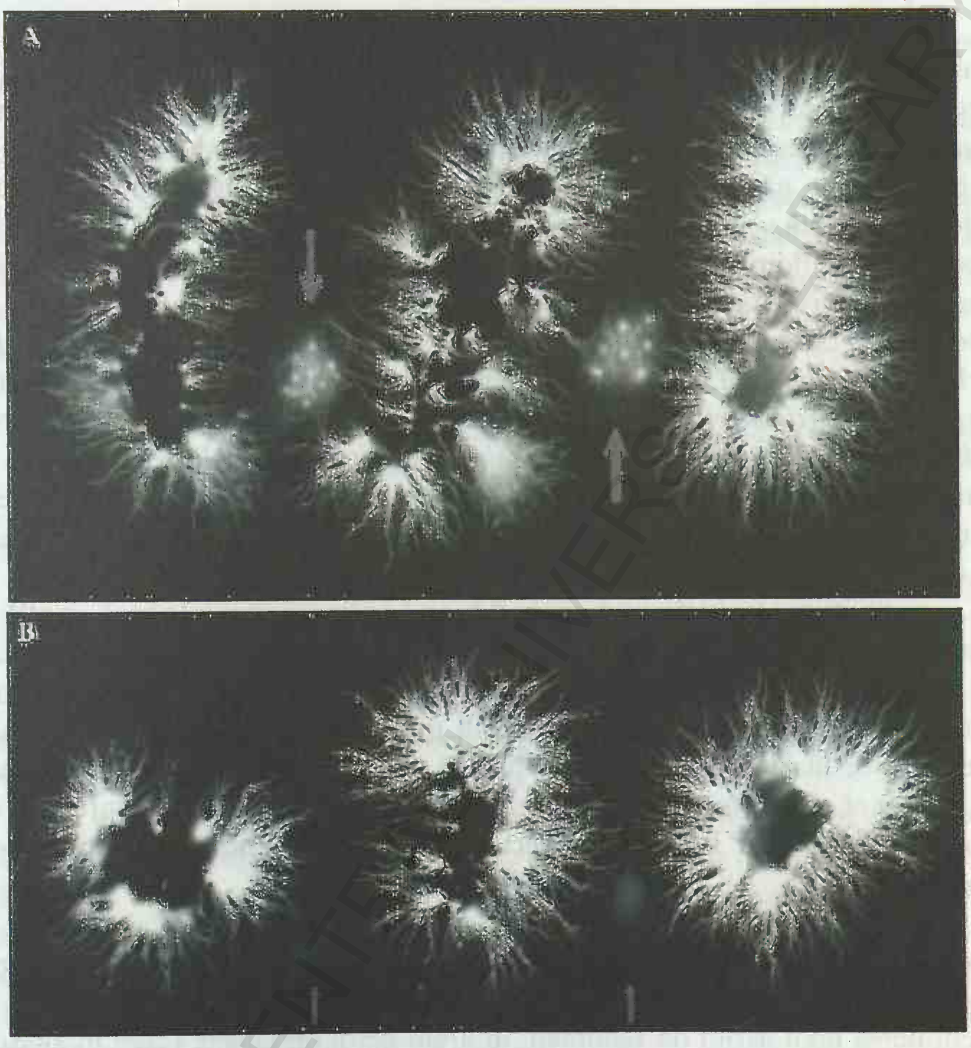


Fig. 45. Imagini electronografice ale tulpinițelor detașate de la vitroplantulele de garoafe, normale (A) sau *hiperhidrice* (B), regenerate *in vitro* din meristeme cultivate pe mediu agarizat *Murashige-Skoog* (1962), în zona bazală a fiecărei tulpinițe fiindu-i conectată terminația câte unui electrod pozitiv. Pe electronografia realizată la plantulele normale (A), pe lângă aura de strimeri se disting numeroase formațiuni, luminoase, punctiforme (zone indicate prin săgeți), care sugerează existența între exvitrotulpinițele alăturate a unor minuscule descărcări energetice, fenomen care lipsește la imaginea electronografică realizată în cazul tulpinițelor *hiperhidrice* (B), cu toate că strimerii lor au o conformație asemănătoare cu aceea a celor observați la vitroplantulele normale.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Problemele privind prevenirea sau anihilarea *hiperhidriei* pot fi analizate și grupate în funcție de factorii exogeni – de ordin ecofiziologic – prezenți în mediul de cultură sau/și în camera de creștere, cum sunt: lumina, temperatura, accesibilitatea oxigenului la vitroculturi, modul de realizare al schimbului de gaze între atmosfera externă și mediul claustrat al recipientelor de cultură, controlarea emisiilor gazoase și a vaporilor din imediata vecinătate a fitoinoculilor, dar și a compoziției chimice și a calității fizice care caracterizează substratul de cultură, aflat în dinamică, pe măsură ce fitoinoculii „avansează în vârstă", ș.a.m.d. Toți acești factori, plus cei endocelulari, joacă un rol hotărâtor în orientarea reacției fitoinoculilor; la acestea se adaugă *particularitățile genetice*, *morfologice* și *biochimice* ale materialului vegetal vitrocultivat. În *hiperhidrie*, situația generală este extrem de complexă și polifactorială, iar reacția fitoinoculilor – în condițiile create – este dependentă de modul de „filtrare" a acestora de către *factorii endogeni* și de capacitatea adaptativă a fitovitroculturilor la regimul creat.

Studiile efectuate în domeniul biotehnologiei vegetale încă se află în stadiul de cercetare a cauzelor potențiale care conduc fitoinoculii la disfuncții adaptative majore, de tipul *hiperhidriei*, ce se traduc – pe plan ultrastructural, citofiziologic și metabolic – prin producerea unor *alterări profunde* ale stării de normalitate ale acestora, fără ca materialul vegetal vitrocultivat să moară ci, dimpotrivă, o lungă perioadă de timp, unele organe afectate de acest sindrom cresc luxuriant, exteriorizând însă un aspect vitros și un port „plăpând".

Întrucât *hiperhidria*, respectiv procesul de *vitrificare* a celulelor și țesuturilor vegetale vitrocultivate, se află sub incidența multor situații provocatoare de disfuncții, principalele cauze care induc și susțin apariția și menținerea unui astfel de fenomen, în afara celor endogene (care în ansamblul lor se constituie în condiții de natură ecofiziologică), se numără și microclimatul din recipientele de cultură și cel din camera de creștere, ce implică factori de factură fizică, chimică și fizico-chimică. Între aceste condiții, cele mai disturbante situații sunt incriminate a fi: *calitatea atmosferei* din recipientele de cultură, sub raport hidric (încărcarea acesteia cu vapori) și gazos (în special prezența *etilenei* și lipsa oxigenului), precum și *compoziția mediului* de cultură, în deosebi statutul fizic al acestuia, respectiv substrat solidificat (și cu ce anume), lichid, semisolid, bistratificat, ori susținerea fitoinoculilor pe suporturi care să permită accesibilitatea – în regim optim – a componentelor mediului de cultură, până la nivelul țesuturilor vitrocultivate, îndeosebi a apei etc.; la cele enumerate se adăugă *regimul de pH*, *temperatura ambientală*, atât în camera de creștere, cât și cea de la baza ori de la vârful recipientelor de cultură, *regimul de iluminare* al vitroculturi-

lor şi, nu în ultimul rând, *interacţionarea acestora*, în totalitatea lor sau pe compartimente.

Majoritatea simptomelor de anomalie *hiperhidrică* sunt, de cele mai multe ori, *nereversibile*; subcultivarea fitoinoculilor *vitrificaţi* pe medii optime inducerii şi susţinerii formării de frunzuliţe nehiperhidrice, uneori poate provoca reversia acestora la starea de normalitate. Astfel, după *Bourque* şi colaboratorii (1989) lăstarii *hiperhidrici* de *Gaillardia pulchella*, generaţi în condiţii de întuneric continuu, transferaţi la lumină, în câteva zile devin normali şi verzi.

2.3.1. METODE DE PREVENIRE A *HIPERHIDRIEI* SAU DE ANIHILARE A ACESTEIA, DUPĂ INSTALAREA EI ÎN ŢESUTURI

2.3.1.1. Modificarea condiţiilor de cultură, în scopul prevenirii apariţiei *hiperhidriei*

Una dintre măsurile eficiente în *prevenirea* producerii *hiperhidriei*, în special la *Rosaceae*, constă în evitarea „suprapopulării" cu fitoinoculi a recipientelor de cultură, mai ales a acelora de capacitate mică.

O altă măsură benefică aplicată în scopul surmontării stării de *hiperhidrie*, la nivelul fitoinoculilor, constă în utilizarea unui mediu de vitrocultură cât mai adecvat, în ceea ce priveşte calităţile fizice şi chimice ale acestuia, în funcţie de tipul materialului vegetal folosit ca inoculi, respectiv natura explantelor, zestrea lor genetică şi scopul urmărit. În consecinţă, în vitroculturile vegetale, pentru prevenirea producerii *hiperhidriei* este de dorit să se aibă în vedere câteva principii de lucru, şi anume:

- în lansarea de noi cercetări, trebuie efectuate tatonări în scopul selectării – în funcţie de specia care urmează să fie vitrocultivată – mediul de cultură optim pentru aceasta, fie pentru iniţierea culturilor primare, fie pentru operarea de subculturi. În general, în literatura de specialitate, pentru vitroculturile vegetale sunt recomandate mediile de cultură solide (*Hauzinska*, 1974; *Davis* şi colab., 1977; *Sutter* şi *Langhans*, 1979; *Monette*, 1983); dacă la nivelul fitoinoculilor *hiperhidria* este manifestă, într-o altă serie de inoculări, se va proceda la creşterea concentraţiei de *agar-agar* în substrat, până la cca. 1% (*Debergh* şi colab., 1981; *Debergh*, 1983; *Hakkaart* şi *Versluijs*, 1983; *Leshem*, 1983a şi b; *Bornman* şi *Vogelmann*, 1984; *Von Arnold* şi *Ericksson*, 1984; *Chavdarov*, 1986; *Rugini* şi colab., 1987); într-o astfel de situaţie, se va avea în vedere faptul

BCU "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

că, prin mărirea concentrației de *agar-agar* în mediul de cultură, la nivelul fitoinoculilor în general, se poate produce o reducere a ratei de formare și de multiplicare a mugurașilor (*Leshem*, 1983a și b; *Ziv* și colab., 1983; *Von Arnold* și *Ericksson*, 1984; *Rugini* și colab., 1987; *Brand*, 1993);

- în cazul mediilor de cultură *lichide*, pentru cultivarea fitoinoculilor este de preferat amplasarea acestora pe punți din hârtie de filtru, măsură care împiedică imersarea materialului vegetal vitrocultivat și care este menită să asigure o cât mai bună oxigenare a acestuia; în loc de punte, sau de cartuș, poate fi utilizat un suport de susținere a fitoinoculilor, realizat din poliester (*Teng* și *Liu*, 2005) sau constituit dintr-o rețea de lignoscheleton (*Cachiță* și colab., 1995);
- în regim de vitrocultură, la speciile sau la soiurile vegetale sensibile la producerea *hiperhidriei*, se recomandă scăderea concentrației de *citochinine* din mediul de cultură (*Werner* și *Boe*, 1980; *Beauchesne*, 1981; *Debergh*, 1983; *Wilkins* și *Dodds*, 1983); în cazul în care este indispensabilă utilizarea *citochininelor*, BA va fi înlocuită – mai ales în mediul lichid de cultură – cu 2iP; *Zimmerman* (1987) considera că tulpinițele readuse din starea de *hiperhidrie*, la starea de normalitate, ulterior vor putea fi cultivate chiar și pe mediu cu BA;
- după *Beauchesne* (1981), *Riffaud* și *Cornu* (1981), *Letouzé* și *Dagiun* (1983), precum și după *Brand* (1993), în cazul vitroculturilor vegetale vulnerabile la regimul *hiperhidric*, se recomandă evitarea utilizării mediilor cu concentrații crescute de NH_4^+, cum este mediul *Murashige-Skoog* (1962), întrucât s-a dovedit că excedentul de amoniu, din acesta, induce procesul de *hiperhidrie* (*Letouze* și *Daguin*, 1983). O descreștere a incidenței *hiperhidriei* cu 82%, la vitroculturile de *Agave tequilana*, a fost realizată – de către *Castro-Concha* și colaboratorii (1990) – dacă din mediul de cultură *Murashige-Skoog* (1962) au fost înlăturați ionii de NH_4^+, iar concentrația de *Gelrite* a fost crescută la 2%; menționăm că, anterior, *Pasqualetto* și colaboratorii (1986) – prin solidificarea mediilor de cultură cu 4 g/l agar-agar, plus 1,5 g/l *Gelrite* – au obținut în substratul de cultură un amestec optimizat, adecvat asigurării unei bune creșteri a vitrolăstarilor de măr;
- la vitroculturile de garoafe, pentru prevenirea producerii *hiperhidriei*, *Yadav* și colaboratorii (2003) au recomandat creșterea concentrației de Fe și/sau de Mg, în mediul de cultură. Aceștia, experimentând cu minibutași de garoafe, au pus la punct un mediu de

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cultură – derivat din mediul de bază *Murashige-Skoog* (1962) – prin creşterea aportului de Fe şi de Mg în substrat (în funcţie de soiul cu care se lucrează), precum şi prin mărirea concentraţiei de *agar-agar*, până la 0,6-0,8%, ceea ce a redus la zero incidenţa *hiperhidriei*; cele două elemente au fost administrate sub formă de sulfaţi, respectiv Fe – 0,15 mM – fiind introdus în compoziţia mediului sub formă de $FeSO_4.7H_2O$, în formularea chelatizată cu EDTA, iar Mg – 2,25 mM – fiind administrat ca $MgSO_4.7H_2O$; balanţa hormonală a constat din 1,34 μM ANA (0,25 mg/l) şi 2,32 μM *chinetină* (0,5 mg/l); temperatura ambientală a fost de 24 ± 2^0C. Procedura s-a dovedit a fi eficientă atât în ceea ce priveşte stimularea formării a şase muguraşi per inocul, cât şi a regenerării din ei de lăstăraşi lipsiţi de *hiperhidrie*. În acelaşi scop, pentru evitarea producerii *hiperhidriei*, la vitroculturile de cartof, *Sarkar* şi colaboratorii (2005) au recomandat introducerea în mediile de cultură a 5-7 mM Ca. Toţi lăstăraşii de cartof, rezultaţi în urma micropropagării lor în condiţiile specificate mai sus, pentru înrădăcinare au fost transferaţi pe un mediu *Murashige-Skoog* (1962) ½, solidificat cu 0,7% *agar-agar*, amplificând la 5,4 μM concentraţia de ANA din substrat. După 15 zile de la operarea subculturii, ex-vitroplantulele au suportat cu succes aclimatizarea lor la regimul septic de viaţă. Aportul unui supliment de Ca (de 5-7 mM), în formula de mediu de cultură destinat micropropagării la cartof, a constituit o măsură benefică în ceea ce priveşte reducerea apariţiei de anormalităţi fenotipice la clonele rezultate, în principal ca urmare a producerii *hiperhidriei* (*Park* şi colab., 2004; *Sarkar* şi colab., 2005);

- tot pentru prevenirea *hiperhidriei*, *Zuccerelli* (1979), *Druart* şi colaboratorii (1981), precum şi *Rugini* şi *Verma*, (1983), au recomandat substituirea parţială a *agar-agarului*, din mediul de cultură, cu *pectină* sau înlocuirea unei părţi din *agar-agar* cu *agar hidrolizat*, adăugat în cantitate de minimum 0,1 g/l, întrucât acesta conţine un complex chimic care în mediile agarizate, în culturile de lungă durată, se epuizează relativ repede, consumat fiind de către celulele vegetale vitrocultivate, concentraţia lui în mediul de cultură descrescând pe măsura prelungirii duratei de creştere *in vitro* a acestora, ceea ce facilitează instalarea proceselor de *hiperhidrie* la nivelul fitoinoculilor; astfel, prin introducerea în mediul de cultură *lichid* a 7 g/l *agar hidrolizat*, la vitroculturile de măr (*Marga*, 1994) s-a putut preveni producerea *hiperhidriei*;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- totodată, pentru evitarea apariției *hiperhidriei*, *Leonhardt* și *Kandeler* (1987) au utilizat *cărbunele activ* 0,3%, ca adaos la mediul de cultură,el fiind un bun adsorbant al etilenei din recipiente, gaz emanat și acumulat excedentar în atmosfera din vasele cu fitoinoculi, din motive variate.

Leshem (1986), subcultivând lunar – timp de 20 de luni - apexuri caulinare de circa 2-3 mm, prelevate de la plantule sau de la lăstari *vitrificați*, a reușit să obțină – în final – lăstari normali; în cazul în care repicarea apexurilor a fost întârziată timp de 6-9 săptămâni, după subcultivarea lor incidența *hiperhidriei* a crescut, iar lăstarii – postînrădăcinare – au generat plantule aparent normale, dar care la anteză au dat naștere la flori de culori variate.

Dar, cercetările teoretice efectuate pe modele experimentale constând din vitroculturi vegetale *hiperhidrice* se referă și la alte aspecte. Astfel, *Zimmerman* și *Scorza* (1996, după *Herman* 1996d și 1997b) au făcut o serie de experimente, cu lăstarii de tutun, prin care aceștia au reușit să realizeze o modificare genetică deosebit de eficientă a meristemului *hiperhidric*, prin bombardarea celulelor acestuia cu particule de aur, operațiune urmată de cocultivarea fitoinoculilor respectivi în prezența lui *Agrobacterium tumefaciens*. În aces mod, din cele 40 de meristeme *hiperhidrice*, utilizate în experimentele menționate, cercetătorii au obținut patru plante transgenice, în timp ce în cazul aceluiași număr de meristeme normale, tratate printr-o aceeași procedură, s-a putut genera o singură plantă transgenică. Autorii menționați au considerat că, prin metoda descrisă se poate îmbunătăți randamentul în transformarea genetică a speciilor lemnoase, recalcitrante. Cercetările lor de microscopie electronică, făcute la nivelul meristemelor *hiperhidrice* de piersic (culturi lichide efectuate în prezența BA), au relevat existența la aceste vitroplantule a unei extinderi mai mari a suprafeței meristemului apical al acestora, ceea ce a determinat ca în cazul utilizării procedurilor de bombardare cu particule de aur a zonelor de acest tip, aria de expunere a celulelor la acțiunea lui *A. tumefaciens* să fie mai extinsă, decât aceea specifică apexurilor normale, mărind astfel eficiența tratamentelor aplicate, facilitând accesul plasmidelor acestor bacterii în genomul speciei cormofitie supusă transformărilor de inginerie genetică.

În cazul micropropagării în masă a unor specii vegetale, de interes economic (cum sunt sparanghelul, plopul, țelina, castraveții etc.), în *bioreactoare*, în medii de cultură *lichide*, pentru evitarea apariției *hiperhidriei* se recomandă ca în compoziția substratului să se adauge un retardant de tipul *ancimidolului* sau cel al *paclobutrazonei*, substanțe care în decursul proliferării și creșterii celulelor determină o descreștere a volumului vacuo-

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lar şi cel al spaţiilor intercelulare, ceea ce reduce absorbţia excesivă de apă în ele, dar şi creşterea în lungime a tulpinilor, precum şi expansiunea limburilor foliare, sporind totodată, geneza de centre multimugurale (*Ziv*, 2005).

Thomas şi colaboratorii (2000), la vitroculturile de pepene verde (*Citrullus lanatus*), au constatat o tendinţă crescută de *hiperhidrie* a ţesuturilor acestora, mai ales în prezenţa în mediul de cultură a unor concentraţii mari de BA. Astfel, concentraţiile ridicate de BA, de 5-10 mM, au stimulat neogeneza de muguraşi, dar şi producerea unei ridicate incidenţe a *hiperhidriei*; în schimb, o scădere a concentraţiei de BA, până la 1 μM, a condus la o reducere însemnată a instalării *vitrificării*, la nivelul fitoinoculilor. Autorii citaţi au menţionat şi faptul că, nodurile apicale şi apexurile propriuzise, subcultivate pe mediu cu 1 μM BA pot genera tulpiniţe normale, în timp ce explantele nodale, bazale, regenerează muguraşi şi lăstăraşi *hiperhidrici*. Utilizând ca agent solidificant *fitagelul*, în doză de 2,5 g/l, sau o concentraţie mai ridicată de *agar-agar*, respectiv 8-10 g/l, şi încorporând în mediu un agent osmotic, de tipul *manitolului* şi a *sorbitolului* (câte 500 mg/l, fiecare), precum şi îmbunătăţind aerisirea recipientelor (chiar şi numai prin obturarea lor cu dopuri de hârtie sau de vată), s-a constatat o reducere a incidenţei *hiperhidriei*, la nivelul fitoinoculilor.

În culturile de lăstari de garoafe, micropropagaţi pe medii solidificate cu *agar-agar*, folosit în concentraţii variate – cuprinse între 0,58 şi 0,85% – *Saher* şi colaboratorii (2005) au reuşit să prevină instalarea *hiperhidriei*, prin răcirea – timp de 28 de zile – a zonei superioare a vaselor de cultură. Prin aceasta, ei au dovedit că în urma răcirii zonei apicale a flacoanelor, concomitent cu creşterea concentraţiei de *agar-agar* în mediu, s-a redus nivelul de H_2O_2 generat în ţesuturi, măsurile luate conducând la o micşorare a stresului oxidativ, scăzând atât *hiperhidria*, cât şi activitatea tuturor enzimelor antioxidante, şi peroxidarea lipidelor.

Pe de altă parte, *Rugini* şi *Verma* (1983) au reuşit să prevină *hiperhidria* în lăstarii cultivaţi pe mediu solidificat cu 0,7% *agar-agar*, prin adaos de 0,5% *pectină*, în mediul de cultură.

O posibilă cale de controlare a *hiperhidriei* a fost descrisă şi de către *Eguchi* şi *Shetty* (1999), în cazul fitoinoculilor de oregano (*Oreganum vulgare*), prin suplimentarea mediului de cultură *Murashige-Skoog* (1962), standard, cu hidrolizate, preparate din proteine de peşte (de exemplu a 1 g/l hidrolizat de cod, ori de heringi). Un astfel de hidrolizat, extras din proteine de peşte, conţine un nivel ridicat de *prolină* şi de *acid glutamic*, precursor al acesteia. În cercetări anterioare (date nepublicate), autorii citaţi au observat la vitroculturile de oregano, că prolina contribuie la prevenirea *hiperhidriei*. În cazul subcultivării de explante nodale, pe un mediu cu adaos de hidrolizat

proteic de heringi, mai mult de 60% dintre inoculii *hiperhidrici* s-au *devitrificat* (după *Herman*, 2000).

În altă ordine de idei, în lumina celor expuse în capitolul precedent, *cocultura* fitoinoculilor cu tulpini ale bacteriei *Pseudomonas* sp. (microorganism care excretă în mediul de cultură *polizaharide* de tip mucoid), a condus la obținerea de rezultate pozitive în prevenirea instalării *hiperhidriei*, la nivelul vitroculturilor vegetale. Astfel, *Shetty* și colaboratorii, încă în anul 1995 au descris o nouă metodă, originală, de prevenire a malformațiilor cauzate de *hiperhidrie*, constând în identificarea și izolarea unei bacterii – dovedită a fi *Pseudomonas* – care prezente fiind în vitroculturi, ca agent infectant, 90% dintre fitoinoculi generează vitroplantule normale, în timp ce culturile neinfectate cu microorganismul respectiv au regenerat sub 50% vitroculturi *nehiperhidrice*. Cocultivarea lăstarilor de oregano, împreună cu tulpini de *Pseudomonas*, a făcut ca frunzulițele acestora să devină opace, pierzându-și transparența și dobândind un conținut sporit de clorofilă; internodiile lăstarilor, pe măsură ce aceștia au crescut, au devenit mai scurte, așa cum sunt ele specifice la vitroplantulele normale (după *Herman*, 1996h). În această direcție, experimentele au fost continuate de către *Shetty* și colaboratorii (1996), *Ueno* și *Shetty* (1996), *Komali* și colaboratorii (1999), precum și de *Strycharz* și *Shetty* (2002), atât cu explante de oregano, cât și cu inoculi de *Coleus ambonicus* și de *Rubus sp.* (*Ueno* și colab., 1998 și *Perry* și colab., 1999). Experimentele lor au constat în cocultivarea fitoinoculilor, cu sau fără adaos de antibiotice în mediile de cultură, în cazul descris fiind vorba de polidină. Comparativ cu culturile martor, cu adaos de polidină, la vitroculturile lipsite de antibiotic s-a înregistrat o îmbunătățire a parametrilor biologici ai fitoinoculilor, atât în ceea ce privește creșterea acestora, cât și sporirea conținutului lor în clorofilă totală, mai ales în frunzulițe, precum și mărirea cu 8% a greutății proaspete a biomasei acumulate per recipient de cultură. Plantulele regenerate din lăstarii de oregano, nu numai că nu au prezentat fenomenul de *hiperhidrie*, ci stresul provocat de bacteria *Pseudomonas* a indus și o stimulare a sintezei de produși secundari de metabolism, în biomasa acestora (*Komali* și colab., 1999).

După *Strycharz* și *Shetty* (2002), *polizaharidele* eliberate în mediu de cultură de către bacteria *Pseudomonas* ar fi cele care ar preveni instalarea *hiperhidriei* în țesuturile vitroculturilor vegetale, inducând, totodată, și o sporire a conținutului fitoinoculilor în *fenoli totali*, ceea ce ar determina o mărire a toleranței vitroplantulelor la prezența în mediul de cultură a altor compuși aromatici. Introducerea de antibiotice în mediul de cultură, cum sunt ampicilina, carbenicilina și cefotaximul, provoacă moartea bacteriilor

şi, în consecinţă, la nivelul fitoinoculilor apare *hiperhidria* (*Perry* şi colab., 1999).

Din cele prezentate în capitolul destinat analizării variatelor forme de manifestare ale *hiperhidriei*, în celulele inoculilor vegetali, precum şi a consecinţelor acestui sindrom metabolic, pe plan morfofiziologic, citologic, catabolic şi anabolic, se poate conclude că, per ansamblu, factorul *genetic* este, de departe filtrul endogen care împiedică (anihilează sau contracarează) acţiunea multiplilor factori microecologici, mai puţin favorabili susţinerii desfăşurării proceselor regenerative normale, la nivelul fitoinoculilor, responsabile de producerea *hiperhidriei*. Concordanţa sau discrepanţa dintre cerinţele interne ale fitoinoculilor, cu particularităţile inerente ale unor organe, ţesuturi sau celule, private de posibilitatea de a fi integrate în sistemul organismului din care acestea derivă (având cerinţe fiziologice variate, în funcţie de stadiul în care se află şi etapele de dezvoltare pe care le au de parcurs), ridică o sumă de probleme şi de reacţii greu de contrabalansat, respectiv de asigurat „cadrul optim" care să conducă inoculii vegetali la regenerarea şi morfogeneza dorită de către cercetători.

În prevenirea *hiperhidriei* sunt vizate a fi luate o serie de măsuri, de ordin vitroecofiziologic, care se cer operate în scopul preîntâmpinării instalării fenomenelor de *hiperhidrie* la nivelul fitoinoculilor, sau pentru anihilarea acestora, după ce ele s-au manifestat deja.

Dar, aşa cum – în funcţie de natura fitoinoculilor – cauzele producerii *hiperhidriei* sunt variate, şi măsurile care se pot lua pentru prevenirea sau înlăturarea consecinţelor sindromului de *vitrificare* sunt diferite, ele – ca eficienţă – neavând un caracter de generalitate, în cazul tuturor tipurilor de fitoinoculi.

O metodă de prevenire a apariţiei *hiperhidriei* poate fi şi aceea a administrării – pe perioada de vitrocultură – în zona de vârf a flacoanelor cu fitoinoculi (dacă este posibil culturi lipsite de BA), a unui curent de aer rece (3-4^{0}C), timp de 3-4 săptămâni. Eficienţa metodei a fost dovedită la vitroplantule de *Prunus amygdalus*, de către *Boxus* şi colaboratorii (1978), şi de *Rugini* şi *Verma* (1983).

Wu şi colaboratorii (după *Herman*, 1998j) au relevat faptul că, elementele rare, adăugate mediului de cultură în care au fost cultivate explante de *Zanthoxylum bungeanum*, au stimulat atât multiplicarea şi creşterea lăstarilor, cât şi rizogeneza, şi au favorizat o controlare a procesului de *hiperhidrie*, ceea ce a facilitat aclimatizarea cu succes a exvitroplantulelor respective.

Acest subiect a fost dezvoltat, ulterior, de către *Wang* şi colaboratorii (2007). Ei au experimentat cu inoculi de *Lepidium meyenii* (o *Brasicaceae* de interes în fitoterapie), întrucât lăstarii acestei specii, regeneraţi din

calus, sunt frecvent *hiperhidrici*, având un conținut ridicat de apă și un nivel scăzut de proteine solubile. În cazul în care în mediul de cultură, preparat astfel încât să asigure inducerea și susținerea proceselor de regenerare de mugurași și de lăstari, au fost introduse săruri care au avut în componența lor La, Ce sau Nd (în concentrații de 0,04 mM – 0,1 mM), *hiperhidria* a fost semnificativ scăzută; la concentrația de 0,1 mM a acestor elemente, în mediul de cultură, în țesuturile lăstarilor regenerați în astfel de condiții, s-a observat o creștere a activității enzimelor cu acțiune antioxidantă, și o descreștere a stresului oxidativ în frunzulițe, fapt care i-a determinat pe autori să considere aceste enzime ca având un rol important în prevenirea *hiperhidriei* (după *Herman*, 2007).

2.4. DEVITRIFICAREA

Prin transferarea plantulelor *hiperhidrice* de pe mediu cu BA, pe un mediu care a avut ca citochinină 2iP, sau chiar pe mediu lipsit total de *citochinină*, *Zimmerman* (1982) a obținut rezultate pozitive în *devitrificarea* plantulelor. Dar, transferarea tulpinițelor *hiperhidrice* pe un mediu lipsit de citochinine a afectat negativ procesul de proliferare de mugurași, la nivelul acestora.

Una dintre metodele, se pare eficiente, de *anihilare* a *hiperhidriei*, odată instalată în lăstarii de *Pediocactus*, a fost raportată ca fiind realizată prin *altoirea* acestora pe vitroplante nevitrificate (*Leonhard* și *Kandeler*, 1987) (vezi subcapitolul precedent).

Ulterior, *Zimmerman* (1984) a dovedit, experimental, că tulpinițele *devitrificate* vor putea fi cultivate din nou pe mediu cu BA. El, împreună cu colaboratorii săi (1987), au constatat că, la inoculii de măr, o măsură benefică – în vederea scoaterii plantulelor din starea de *hiperhidrie* – a fost aceea a modificării concentrației sărurilor minerale în substratul de cultură, concomitent cu trecerea vitroculturilor repicate pe astfel de medii, timp de mai multe luni, la temperatura de 4°C. Ulterior, *Maene* și *Debergh* (1987) răcind baza vaselor de cultură au reușit să împiedice deshidratarea substratului, scăzând concentrația de vapori de apă în atmosfera din zona apicală a recipientelor cu fitoinoculi, fapt care a stimulat evapotranspirația la nivelul vitrofrunzulițelor, îmbunătățindu-se astfel atât creșterea lăstarilor, cât și calitatea acestora. Într-un astfel de regim termic, respectiv la temperaturi coborâte, dar pozitive – mai ales dacă compoziția mediului de cultură a fost mai săracă în săruri minerale – rizogeneza a fost îmbunătățită. Mai apoi, *Taji* și *Williams* (1989) au descoperit că *hiperhidria*, la lăstarii regenerați din hipocotile sau din segmente de cotiledoane de *Clianthus formosus*, poate

fi redusă prin menținerea culturilor la temperatura de 5^0C, timp de zece zile, înainte ca acestea să fie transferate la temperatura camerei. Totodată, extinderea *hiperhiriei* la culturile de noduri de *Olearia microdisca* a fost diminuată, dacă vasele cu fitoinoculi au fost amplasate în camere de creştere, în care regimul termic a fost reglat la o temperatură de 5^0C; dar, la această temperatură neoformarea de muguraşi şi creşterea lăstarilor a fost foarte redusă (*Williams* şi *Taji*, 1991). *Pérez-Tornero* şi colaboratorii (2001) au reuşit să readucă lăstarii *hiperhidrici* de *Prunus armeniaca*, la o stare de normalitate, după amplasarea vitroculturilor – timp de trei săptămâni – într-un sistem de răcire, centrat pe scăderea temperaturii în zona de vârf a flacoanelor de cultură.

Fiind preocupați de problema *hiperhidriei* fitoinoculilor, *Zimmerman* şi colaboratorii (1995) au elaborat un mediu de cultură în care au înlocuit *agarul* cu un amestec constând în *amidon* de porumb şi *Gelrite*, cu ajutorul căruia aceştia au reuşit să elimine *hiperhidria* la şase cultivari de măr şi la două varietăți de coacăz roşu. Ei au considerat că polizaharidul amidon poate să acționeze ca un agent antivitrificant, controlând nivelul hidric în recipientele de cultură. Totodată ei au considerat că un astfel de mediu de cultură este mai simplu de preparat, este cu cel puțin 15% mai puțin costisitor şi, în plus, la nivelul inoculilor se regenerează un număr mai mare de neotulpinițe (*Herman*, 1996j).

În Spania, la universitatea din Oviedo, *Majada* şi colaboratorii (după *Herman*, 1998i) au reuşit să prevină producerea *vitrificării* la nivelul inoculilor constând din lăstari de garoafe, cultivați pe mediu lichid, în regim de micropropagare, în sistem automatizat, controlând ventilarea vaselor de cultură prin utilizarea unor capace speciale de închidere a recipientelor, constituite din filtre selective permeabile pentru gaze, menținând umiditatea la parametri optimi, măsură care nu a redus rata de multiplicare a fitoinoculilor. Autorii citați au susținut că, printr-o astfel de procedură nu numai că a fost redusă *hiperhidria*, în faza de creştere logaritmică a lăstarilor, ci a fost asigurată şi o reversie a tulpinițelor *vitrificate* la starea de normalitate, favorizând, totodată, formarea de noi lăstari.

Tisserat (2005), care a micropropagat explante caulinare de *Liquidambar styraciflua* utilizând un sistem de cultură în regim de imersie, a reuşit să obțină – în opt săptămâni – regenerarea a câte 400-500 de lăstari, față de numai 40 de exemplare în vase de tip Magenta. Dar, în sistem de imersie temporară a fitoinoculilor, peste 80% dintre aceştia au devenit *hiperhidrici*. În ideea îmbunătățirii procentului de înrădăcinare şi de supraviețuire – în perioada de aclimatizare a lor după plantarea acestora în sol – el a introdus un curent permanent de CO_2 în atmosferă din sistem, concentrația

acestuia fiind de 10.000 µL/litru. Acest procedeu a stimulat rizogeneza. Autorul a considerat că o astfel de metodă poate fi utilizată și în micropropagarea altor specii lemnoase sau ierboase, pe perioada aclimatizării menținându-se în incintele de aclimatizare un aport ridicat de CO_2 și o umiditate ridicată.

Dar, nu numai *citochininele* sau acidul *picolinic* induc producerea *hiperhidriei* la nivelul unor fitoinoculi, ci și *ancimidolul*, un retardant cu efect inhibitor asupra sintezei giberelinei. În mediile lichide de cultură, *Chen* și *Ziv* (2001) după patru săptămâni de vitrocultură a unor muguri de narcise, în prezența ancimidolului, din explante s-au regenerat lăstari *hiperhidrici*. Fragmente explantate din zonele bazale ale frunzulițelor *hiperhidrice* au fost subcultivate pe un același tip de mediu; după șase săptămâni de la operarea subculturii, întregul inocul foliar a fost acoperit de centrii meristematici formând conglomerate; la finele a opt săptămâni de vitrocultură per fiecare nodul meristematic s-au regenerat câte 35 mugurași; în contrast cu acest aspect, la inoculii de același tip, crescuți pe mediu lipsit de ancimidol, nu s-a format niciun centru meristematic. În momentul în care nodulii meristematici au fost transferați pe mediu MS agarizat, cu adaos de ancimidol, din fiecare asemenea conglomerat de mugurași s-au dezvoltat aproximativ 19 plante normale. După autorii citați, aceste rezultate pot fi utilizate în sistemele de micropropagare pe scară largă a narciselor.

În urma unor studii efectuate de către o echipă de cercetători de la Facultatea de Științe, a Universității din Oradea (*Cachiță* și colab. 2007-2008), pe mai multe specii vegetale, vitrocultivate, cu predispoziție la *hiperhidrie* (de exemplu: sfecla de zahăr, *Coleus*, petunie etc.), cu apă Pi sau cu apă sărăcită în deuteriu (ASD), s-a reușit nu numai să se prevină *vitrificarea* vitroplantulelor, ci chiar – în cazul culturilor în dublu-strat – să se anihileze acest fenomen neoplazic deja declanșat, mai ales la nivelul tulpinițelor înălțate deasupra supernatantului (proceduri în curs de brevetare).

Cele expuse în prezentul volum reliefează importanța studiilor din domeniul biotehnologiei vegetale, efectuate prin intermediul tehnicilor de cocultivare *in vitro* a variatelor combinații de fitoinoculi, cu sau în lipsa unor parteneri, mai îndepărtați ori mai apropiați din punct de vedere genetic. Astfel de cercetări servesc la o mai bună cunoaștere a biologiei celulelor gazde ale unor parteneriate simbionte, sau a consecințelor unor atacuri fitopatogene. Dar, după cum s-a putut constata, asemenea studii au condus la descoperirea și dezvoltarea unor importante laturi practice, valorificate în special în horticultură și în silvicultură.

FOUNDATION CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie

Aitken-Christie, J., Jones, C., Bond, S., 1985, Wet and waxy shoots in *radiata* pine micropropagation. ActaHortic., nr. 166, p. 93-100.

Aitken-Christie, J., Singh, A.P., 1987, Cold storage of tissue cultures, *Cel Land Tissue Culture in Forestry*. (Ed.coord.) Bonga, J.M., Durzan, D.J., (Edt) Martinus Nijhoff, Dordrecht, vol 2, p. 285-304.

Aitken-Christie, J., Thorpe, T.A., 1985, Clonal propagation: Gymonosperms., In: *Cell Culture and Somatie Cell Genetics of Plants*, (Ed). Vasil, I.K., vol. 1, (Edt.) Academic Press, New York, p. 82-95.

Akiyoshi, D.E., Regier, D.A., Jen, G., Gordon, M.P., 1985, Cloning and nucleotide sequence of the tzs gene from *Agrobacterium tumefaciens* strain T 37. Nucleic Acids Res., nr. 13, p. 2773-2788.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Rass, M., Roberts, K., Watson, J., 1989, Cancer. In: *Molecular Biology of the Cell*. (Ed.coord.) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Rass, M., Roberts, K., Watson, J. (Edt.), New-York, NY: Garland, p. 1187-1216.

Al-Mallah, M.K., Davey, M.R., Cocking, E.C., 1990, Nodulation of oilseed rape (*Brassica napus*) by rhizobia. J. Exp. Bot., nr. 41, p. 1567-1572.

Altman, A., Kaur-Sawhney, R., Galston, W.A., 1977, Stabilization of oat leaf protoplasts through polyamine-mediated inhibition of senescence. Plant Physiol, nr. 60, p. 570-574.

Anders, F., 1958, Aminosäuren als gallenerregende Stoffe der Reblaus [*Viteus* (*Phylloxera*) *vitifolii*, Shimer]. Experientia, nr. 14, p.62.

Angelini, R., Federico,R., 1989, Histochemical evidence of polyamine oxidation and generation of hydrogen peroxide in the cell wall. J. Plant Physiol, nr. 135, p. 212-217.

Augier De Montgremier, H., Limasset, P., Morel, G., 1948, Sur le maintien d'une maladie à virus complexe dans des tissus de Tabac cultivés *in vitro*. *C.R. Ac. Sc.*, nr. 227, p. 606-608.

Bader, S.M., Cachiță, C.D., Crăciun, C., 1981, Modificări ultrastructurale în vacuolele celulelor explantelor de *Forsythia*, cultivate *in vitro*. În: Primul *Simp. de Cult. de Țes. și Cel. Veg.* Cluj-Napoca, intitulat: *Culturile de țesuturi – instrument de cercetare în biologia vegetală teoretică și practică*, Cluj-Napoca 1979 (Ed.coord.) Preda, V., Puia, I., Cachiță, C.D., Sopa, S., Almășan, B.M., Tipo Agronomia Cluj-Napoca, Romania, p. 413-421.

Balen, B., Krsnik-Rasol, M., Simeon-Rudolf, V., 2003, Isoenzymes of esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. J. Plant Physiol. Nov; vol. 160, nr. 11, p. 1401-1406.

Bapat, V.A., Ganapathi, T.R., 2005, Hairy roots – a novel source for plant products and improvement. Nat. Acad. Sci. Lett., vol. 3-4, nr. 28, p. 61-69.

Baumann, G., 1972, Wichtige viruskrankheiten des Kern-und Steinobstes. Erwerbsobstbaru, nr. 14, p. 177-198.

Bayer, M.H., 1982, Genetic tumors: physiological aspect of tumor formation in intespecies hybrids. In: *Molecular Biology of Plant Tumors*, (Ed.coord.) Kahl, G. and Schell, J.S., (Edt.), New York, NY: Acad. Press, p. 33-67.

Beaty, J.S., Powell, G.K., Lica, L., Regier, D.A., MacDonald, E.M.S., Hommes, N.G., Morris, R.O., 1986, TZS, a nopaline Ti plasmid gene from *Agrobacterium tumefaciens* associated with trans-zeatia biosynthesis. Mol. Gen. Genet., nr. 203, p. 274-280.

BABEŞ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Beauchesne, G., 1981, Les milieux mineraux utilises en culture in vitro et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologiqu. C.R. Acad Agric Paris, nr. 67, p. 1389-1397.

Becard, G., Fortin, J.A., 1988, Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri-T-DNA transformed roots. New Phytol. nr. 108, p. 211-218.

Beckman, C.H., 2000, Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? Physiol. Mol. Plant Pathol., nr. 57, p. 101-110.

Bednar, T.W., Linsmaier-Bednar, E.M., 1989, Chemical carcinogenesis in plants and interaction with viruses and cancer causation. In: *Comparative Aspects of Tumor Development*, (Ed.coord.) Kaiser, H.E. (Edt). Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., p. 240-248.

Beleș, D., Cachiță, C.D., 2007, Aclimatizarea exvitroplantulelor de *Pistia stratiotes* L. pe medii preparate cu apă sărăcită în deuteriu. In: *Lucr. celui de al XV–lea Simp. Nat. de Cult. de Țes. și Cel. Veget.*, Iași 2006, intitulat: Micropropagarea speciilor vegetale. (Ed. coord.) Cachiță, C.D., (Edt.) Risoprint, Cluj-Napoca, p. 173-181.

Benson, E.E., Al-Mallah, M.K., Davey, M.R., Cocking, E.C., 1990, Enzyme-induced nodulation of *Brassica napus* by *Rhizobium*. In: *Nitrogen fixation: achievements and objectives*. (Ed.coord.) Gresshoff, P.M., Roth, E.C., Stacey, G., Newton, W.E., (Edt.). New York: Chapman and Hall.

Bergman, L., 1959a, *Plant viruses in tissue culture. Trans. N.Y. Acad. Sci.* ser. II, nr. 21, p. 227.

Bergman, L., 1959b, Űber den Einflus von Thiouracil und Cytovirin auf das Wachstum und die Virusproduktion isolierter Tomatenwurzeln. *Phytopath. Z.*, nr. 34, p.209.

Bernard, N., 1911, Sur la function fungicide des bulbes d'Ophrydées. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, nr. 14, p. 221-258.

Beruto, M., Lanteri, L., Portogallo, C., 2004, Micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). Plant Cell Tiss. Organ Cult., vol. 79, nr. 2, p. 249-255.

Bianciotto, V., Minerdi, D., Perotto, S., Bonafante, P., 1996, Attachment of rhizosphere bacteria to the cell surface of arbuscular mycorrhizal fungi. In: *Novel biotechnological approaches to plant production: from sterile root to mycorrhizosphere*. Joint COST meeting 8.21, Pisa, Italy, p. 16.

Bieleski, R.L., 1973, Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. Annu. Rev. Plant Physiol., nr. 24, p. 225-252.

Bisbis, B., Billard, J.P., Hualt, C., Kevers, C., Le Dily, F., Gaspar, T., 1998, Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid via the Shemin pathway in a green sugar beet callus. Biol. Plantarum, vol. 40 nr. 4. p. 493-497.

Bisbis, B., Kevers, C., Crèche, J., Rideau, M., Gaspar, T., 1998, Differential growth dependecy of normal and habituated sugarbeet cell lines upon endogenous ethylene production and exogenous ethylene application. Physiologia Plantarum 103, p. 201-208.

Bisbis, B., Le Dily, F., Kevers, C., Billard, J.P., Huault, C., Gaspar, Th., 1993, Disturbed sugar metabolism in a fully habituated nonorganogenic callus of *Beta vulgaris* (L). Plant Growth Regulators, nr. 13, p. 257-261.

Black, L.M., 1945, A virus tumor disease of plants. *Amer. J. Bot.*, vol. 32, p. 408.

Black, L.M., 1949, Virus tumors. *Survey Biol. Progr.* nr. 1, p. 155.

Black, L.M., 1957, Viruses and other pathogenic agents in plant tissue cultures. *J. Nat. Cancer Inst.*, nr. 19, p. 663.

Bloom, A.J., 1998, Assimilation of mineral nutrients. In: *Plant Physiology*. (Ed.coord.) Taiz, L., Zeiger, E., (Edt.). Sundreland, M.A:Sinauer Assocuates, p. 323-346.

Bonga, J.M., Von Aderkas, P., 1992, *In Vitro Culture of Trees*. (Edt.) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers.

Borkowska, B., Michalczuk, L., 1987, The physiological disorders of sour cherry cultures: necrosis and vitrification. ActaHortic, nr. 212, p. 235-237.

Bornman, C.H., Vogelmann, T.C., 1984, Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitions bud formation and vitrification in *Picae abies*, Physiol. Plant., nr. 61, p. 505-512.

Bötteher, I., Göring, H., 1987, Die Vitrifikation der Pflanzen bei der in vitro-Kultur als Infiltration problem, Biol Rundsch, nr. 25, p. 191-193.

Böttcher, I., Zoglauer, K., Göring, H., 1988, Induction and reversion of vitrification of plants cultured in vitro. In: Physiol. Plant. nr. 72, p. 560-564.

Bouchet, M., Gaspar, Th., Thorpe, T.A., 1978, Soluble and cell-wall peroxidases and auxin destruction in normal and habituated tobacco callus. In Vitro Cell Develop Biol, nr. 14, p. 819-823.

Boulay, M., 1979, Multiplication et clonage rapide du *Sequoia sempervirens* par la culture *in vitro*. În: *Micropropagation d'Arbres Forestiers*. Assoc. Forét-Cellulose. Nangis, France. p. 49-56.

Bourque, J.E., Tanner, S, Mabry, T.J., 1989, *In vitro* regeneration of *Gaillardia pulchella* Foug. Plant Cell Tiss. Organ Cult., nr. 16, p. 67-72.

Boysen-Jensen, P., 1952, Untersuchungen über die Bildung der Galle von *Mikiola fagi. K. Danske Videnskab. Seskab. Biol.*, vol. 18, nr.18.

Boxus, P., Druart, P., Brasseur, E., 1978, Rapport d'Activités du Centre de Recherches agronomiques de Gembloux, CRA, Gembloux, p. 126-127.

Boxus, P., Paques, M., 1987, Métode et composition de lutte contre le phénomène de vitrification au cours de la micropropagation in vitro des plantes, Demande de brevet européen 878770054.1 22.04.87 publication 0 247018 European Patent Office.

Boxus, P., Jemmali, A., Piéron, S., 1995, Multiplication végétative: Micropropagation. In: *Biotechnologies végétales*. (Ed.coord.) Demarly, Y., Picard, E., (Edt.). Inst. Rennes-CNED, AUPELF. UREF, p. 5-116.

Brainerd, K.E., Fuchigami, L. H., 1981, Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. J. Am. Soc. Hort. Sci., nr 106, p. 515-518.

Brainerd, K.E., Fuchigami, L.H., 1982, Stomatal functioning of in vitro and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA and CO_2. J. Exp. Bot. nr. 33, p. 388-392.

Brakke, M.K., Nickell, L.G., 1951, Secretion of α-amylase by *Rumex* virus tumors *in vitro*. Properties and assay. *Arch. Biochem. Bioph.*, nr. 32, p. 28-41.

Brakke, M.K., Nickell, L.G., 1955, Secretion of an enzyme from intact cells of a higer plant tumor. *Ann. Biol.*, nr. 31, p. 215-224.

Brand, M.H., 1993, Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots in vitro. Plant Cell, Tiss. Oragan Cult., vol. 3, nr. 35, p. 203-209.

Braun, A.C., 1941, Development of secondary tumors and tunor strands in the crown-gall of sunflowers. *Phytopathology* nr. 31, p.135.

Braun, A.C., 1956, The activation of two growth-substance systems accompanying the conversion of normal to tumor cells in crown-gall. *Cancer Res.*, nr. 16, p. 53.

Braun, A.C., 1958, A physiological basic for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash*, nr. 44, p. 344.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Braun, A.C., 1972 – The relevance of plant tumor systems to an understanding of basic cellular mechanisms underlying tumorigenesis. Progr. Exptl. Tumor Res, nr. 15, p. 165-187.

Braun, A.C., 1978, Plant tumors. Biochem Biophys. Acta 516, p. 167-191.

Braun, A.C., Lipetz, J., 1966, The use of tissue culture in phytopathology. In: *Cells and Tissues in Culture. Methods, Biology and Phsiology*. Willmer, E.N., Ed. vol. 3, Academic Press, London, New York, p. 691-716.

Braun, A.C., Morel, G., 1950, A comparison of normal, habituated and crown-gall tumor tissue implants in the European grape. *Amer. J. Bot.*, nr. 37, p.499.

Braun, A.C., White, P.R., 1943, Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown-gall tumors. *Phytopathol.*, nr. 33, p. 85-100.

Braun, A.C., Wood, H.N., 1976, Supression of the neoplastic state with the acquistion of specialized functions in cells, tissues, and organs of crown gall teratomas of tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, nr. 73, p. 469-500.

Brezeanu, A., Călin, A., Cornea, P., Costache-Iordan, M., 1996, Cytological peculiarities of the tumoral tissue cells induced by wild and genetic modified strains (kanamycin resistant) of *Agrobacterium tumefaciens*. Rev. Roum Biol., nr. 41, p. 57-67.

Brezeanu, A., Maximilian, C., Vătafu, I., Zamfir, M., 1998, Oncogenity and plant protooncogenes. În: *Current Problems in Cellular and Molecular Biology*, vol. III, (Ed.coord.) Craciun, C., Ardelean A., (Edt.). Risoprint Cluj-Napoca, p. 411-421.

Brezeanu, A., Voichița, C., 2006, Putem considera oncoza o formă de manifestare a morții celulare programate la plante. În: *Lucr. celui de al XIV-lea Simp. Naț. de Cult. de Țes. și Cel. Veget.*, Sibiu 2005, intitulat: *Conservarea vitroculturilor vegetale*. Ed. coord. Cachiță, C.D. și Sand, C., (Edt.). Alma Mater, Sibiu, p. 87-97.

Bridgen, M.P., Staby, G.L., 1981, Low pressure and low oxigen storage of plant tissue cultures. Plant Sci Lett nr. 22, p. 177-186.

Burdon, R.H., 1996, Control of cell proliferation by reactive oxygen species. Biochem Soc Transact, nr. 24, p. 1028-1032.

Burkholder, P.R., Nickell, L.G., 1949, Atypical growth of plants. 1. Cultivation of virus tumors of *Rumex* ov nutrient agar. *Bot. Gaz.*, nr. 110, p. 426-437.

Bursch, W., Oberhammer, F., Schule-Hermann, R., 1992, Trends Pharmacol. Sci., nr. 13, p. 245-251.

Butcher, D.N., Firmin, J.L. Searle, L.M., 1980, The role of tissue culture in the study of crown-gall tumorigenesis. In: *Tissue Culture Method for Plant Pathologist*, (Ed.coord.) Ingram, D.S., Helgeson, J.P., (Edt.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburg, Boston, Melbourne, p. 203-208.

Cachiță, C.D., 1987, *Metode „in vitro" la plantele de cultură. Baze teoretice și practice*. Ed. Ceres. București.

Cachiță C.D., 2000, Culturile de țesuturi și celule la plante – modele experimentale în biologia vegetală., În: *Lucr. celui de al IX-lea Simp. Naț. de Biotehnol. Veget.*, Constanța 1999, intitulat: *Actualități și perspective în biologia vegetală*. (Ed. coord.) Cachiță, C.D., Bavaru, A., Brezeanu, A., (Edt.) Univ. „Ovidius" din Constanța, p. 31-40.

Cachiță C.D., 2001, Conceptul de celulă neoplazică, la unele culturi cormofitice "in vitro". În: *Volum Omagial "T.Maghiar" la 65 de ani de viață*, Analele Univ. din Oradea, Univ. Oradea, p. 299-304.

Cachiță, C.D., Ardelean, A., 2004, Vitroculturile vegetale în fitopatologie. În: Lucr. celui de *al XII-lea Simp. Naț. de Cult. de Țes. și Cel. Veget.* Jibou 5 iunie 2003, intitulat:

BCU CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Fiziologia celulei vegetale în regim de vitrocultură. (Ed. coord.) Cachiță, C.D., Ardelean, A., Fati, V., (Edt.) Daya Satu Mare, p. 18-29.

Cachiță, C.D., Ardelean, A., 2005, Implicarea vitroculturilor vegetale în studierea cancerului la plante. Studia Univ. de Vest „Vasile Goldiș" Arad, Seria Șt. Vieții, vol. 15, p. 59-68.

Cachiță, C.D., Crăciun, C., 1990, Ultrastructural studies of some ornamentals. În: *Handbook of Plant Cell Culture* vol.5 *Ornamental Species*. (Ed.coord.) Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S., (Eds), McGrow Hill Publishing Company, New-York, p. 57-94.

Cachiță, C.D., Crăciun, C., 2004, Hiperhidria la vitroculturile de cormofite – o boală fiziologică neoplazică. În: *Lucr. celui de al XII-lea Simp. Naț. de Cult. de Țes. și Cel. Veg.,* Jibou 5 iunie 2003, intitulat: *Fitopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură.* (Ed. coord.) Cachiță, C.D., Ardelean, A., Fati, V., (Edt.)., Daya Satu Mare, p. 30-42.

Cachiță, C.D., Crăciun, C., Burzo, I., 1991, Ultrastructural alterations in vitrified plant cell, În: *The IVth National Symposion on Plant Cell and Tissue Culture.*, Cluj-Napoca 1989, intitulat: *In vitro explant cultures – present and perspective.* (Ed.) *Cachiță, C.D.*, (Edt.). Biol. Reseach. Inst. Cluj-Napoca, p. 141-151.

Cachiță, C.D., Petruș, C.M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C., 2008, Fenomenul de hiperhidrie manifest la nivelul vitroculturilor de sfeclă de zahăr (*Beta vulgaris* L var. saccharifera). I. Aspecte de microscopie optică surprinse în țesuturile limburilor frunzulițelor normale și a celor hiperhidrice. Analele SNBC (Ed.coord.) Crăciun, C. și Ardelean, A.. vol. XIII, cap. II. Date morfofiziologice și biochimice, (Edt.) Risoprint Cluj-Napoca, p. 101-112.

Cachiță, C.D., Petruș, C.M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C., 2008a, Fenomenul de hiper-hidrie manifest la nivelul vitroculturilor de sfeclă de zahăr (*Beta vulgaris* L. var. saccharifera). II. Aspecte ultrastructurale identificate în celulele țesuturilor limburilor foliare ale plantulelor normale sau ale vitroplantulelor hiperhidrice. Analele SNBC (Ed.coord.) Crăciun, C. și Ardelean, A. vol. XIII, cap. II. Date morfofiziologice și biochimice, (Edt.) Risoprint Cluj-Napoca, p. 113-127.

Cachiță, C.D., Petruș, M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C., 2008b, Hyperhydricity phenomenon developed at the level of sugar beet *(Beta vulgaris L. var. Saccharifera)* vitrocultures. III. Ultrastructural aspects observed in the hyperhydric callus cells. Studia Universitas „Vasile Goldiș" Arad. Ser. Științele Vieții, vol. 18 (Supliment), (Edt.) „Vasile Goldiș" University Press Arad, p. 53-64.

Cachiță C.D., Petruș, M., Petruș-Vancea, A., Crăciun, C., 2008c, Hyperhydricity phenomenon developed at the level of sugar beet (*Beta vulgaris L.* var. Saccharifera) vitrocultures. IV. Deuterium depleted water effects in hyperhydricity annihilation of vifroleaflet cells, aspects viewed to optic and transmission electronic rnicroscope. Studia Universitas „Vasile Goldiș" Arad. Ser. Științele Vieții, vol. 18 (Supliment), (Edt.) „Vasile Goldiș" University Press Arad, p. 25-34.

Cachiță, C.D., Turcuș, V., Hurgoi, F., Petruș-Vancea, A., 2008d, Coculturi de durată, produse spontan, între fitoinoculi și un fung saprofit. În: Biotehnologii vegetale pentru secolul XXI, Lucr. celui de al XVI-lea Simp. Naț. de Cult. de Țes. și Cel. Veg., București, iunie 2007, (Ed. coord.) Cachiță, C.D., Brezeanu, A., Ardelean, A., (Edt). Risoprint, Cluj-Napoca, p. 169-175.

Cachiță, C.D., Turcuș, V., Petruș-Vancea, A., Barbu-Tudoran, L., Crăciun, C., 2008e, *Drosera rotundifolia* L. vitroculture associated with a saprophyte fungus, Studia Uni-

versitas „Vasile Goldiș" Arad. Ser. Științele Vieții, vol. 18, p. 103 106.

Cachiță, C.D., Vicol, A., Gergely, M., 1995, Suport vegetal pentru cultură în sisteme hidroponice. Brevet de inv. RO, nr. 110018C1.

Campbell, A.J., Best, M.W., 1964, The effect of heat therapy on several apple viruses. Ann. Rep. Agr. Hort. Res. Sta. Long Ashton, England 1963, p. 65-70.

Campell, B.R., Town, C.D., 1991, Physiology of hormone autonomous tissue lines derived from radiation-induced tumors of *Arabidopsis thaliana*. Plant. Physiol., vol. 97, p. 116-117.

Camus, G., Gautheret, R.J., 1948a, Sur le caractère tumoral des tissus de *Scorsonère* ayant subi le phenomène d'accoutumance aux hétéro-auxines. *C.R. Acad. Sci., Paris*, nr. 226, p.744.

Camus, G., Gautheret, R.J., 1948b, Sur le repiquage des proliférations induites sur les fragments de racines de *Scorsonère* par des tissus de crown-gall et des tissus ayant subi le phenomène d'accoutumance aux hétéro-auxines. *C.R. Soc. Biol., Paris*, nr. 142, p. 771.

Candresse, T., Macquaire, G., Monsion, M., Dumez, J., 1988, Detection of chrysanthemum stunt viroid CSV using nick translate probes in a dot blot hybridization assay. J. Virol Methods, nr. 20, p. 185-194,

Cardenal, L.R., Pinzón, E.R., Maldonado, J.P., 2008, Revigorización y clonación de yemas adultas de árboles de olivo: establecimiento *in vitro* de microinjertos. Bioagro, vol. 20, nr. 1, p. 57-65.

Carrié, B., Bisbis, B., Penel, C., Gaspar, Th., Greppin, H., 1994, Disturbed sugar metabolism in a fully habituated nonorganogenic callus of *Beta vulgaris*. Additional data. Saussurea 25, p. 143-151.

Carrié, B., Gaspar, Th., Greppin, H., Penel, C., 1994a, Redox characteristics of normal and habituated cell lines of sugarbeet. Plant Cell and Environ, nr. 17, p. 457-461.

Carletti, S.M., Arjona, C., Caceres, E.R., Llorente, B.E., 1995, Use of *Azospirillum brasilense* as root growth promoter on *in vitro* cultured MM 111 apple (*Malus domestica* Borkh). In: *Segundo Encuentro Latinoamericano de Biotecnologia Vegetal REDBIO'95*. Puerto Iguazu, Misiones, Argentina. A-25.

Carletti, S.M., Llorente, B.E., Caceres, E.R., 1994, Influences of PGPR strains on jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider) micropropagated *in vitro*. In: *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. Proccedings of the Third International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*. Australia., p. 36.

Carletti, S.M., Llorente, B., Caceres, E.R., Tandecarz, J.S., 1998, Jojoba inoculation with *Azospirillum brasilense* stimulated *in vitro* root formation. Plant Tissue Culture and Biotechnology, vol. 4, nr. 3-4, p. 165-174.

Caro, L.A. Santecchia, N., Marinangeli, P.A., Curvetto, N.R., Hernández, L.F., 2003, *Agrobacterium rhizogenes* vs auxinic induction for *in vitro* rhizogenesis of *Prosopis chilensis* and *Nothofagus alpina*. Biocell, vol. 27, nr. 3, p. 311-318.

Carrié, B., Bisbis, B., Penel, C., Gaspar, Th., Greppin, H., 1994a, Disturbed sugar metabolism in a fully habituated nonorganogenic callus of *Beta vulgaris*. Additional data. Saussurea, nr. 25, p. 143-151.

Carrié, B., Gaspar, Th., Greppin, H., Penel, C., 1994b, Redox characteristics of normal and habituated cell lines of sugarbeet. Plant Cell and Environ, nr. 17, p. 457-461.

Cassells, A.C., 1991, Problems in tissue culture contamination. In: *Micropropagation* (Ed. coord.) Debergh, P.C., Zimmerman, R.H. (Edt.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 31-44.

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

Cassells, A.C., Long, R., 1980, Tobacco explant culture as a screening system for antiviral chemicals. In: *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. (Ed.coord.) Ingram, D.S., Helgeson, J.P., (Edt.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburg, Boston, Melbourne, p. 131-138.

Chavdarov, J., 1986, Micropropagation and cloning *in vitro* of decorative plants. Genet Breed, nr. 19, p. 373-383.

Chakrabarty, D., Park, S.Y., Ali, M.B., Shin, S.K., Paek K.Y., 2006, Hyperhydricity in apple: ultrastructura land physiological aspects, Tree Physiology, nr. 26, p. 377-388.

Chambers, J., 1961, The production of virus – free raspberry plants. J. Hort. Sci., nr. 36, p. 48-54.

Chen, T.W., Schere, S., Boger, P., 1992, Nitrogen fixation of *Azorhizobium* in artificially induced root para-nodules in wheat. Sci. China (Series Bi), nr. 35, p. 1463-1469.

Chen, T.W., Xie, Y.X., Chen, W.H., 1991, Nitrogenase activity of *Azorhizobium* in the induced root para-nodules in wheat nodules. Nature J. (Chinese), nr. 14, p.268-272.

Child, J.J., 1975, Nitrogen fixation by a *Rhizobium* sp. in association with nonleguminous plant cell cultures. Nature, nr. 253, p. 350-351.

Child, J.J., Kurz, W.G.W., 1978, Inducing effect of plant cells on nitrogenase activity by *Spirillum* and *Rhizobium* in vitro. Can. J. Microbiol., nr. 24, p. 143-148.

Chriqui, D., 1995, Génie génétique, In: *Biotechnologies végétales*, (Ed.coord.) Demarly, Y., Picard, E., (Edt). UNISAT Univ., CNED, Rennes CEDEX 9.

Christiansen-Weniger, C., 1992, N_2-fixation by ammonium-excreting *Azospirillum brasilense* in auxin induced root tumors of wheat *(Triticum aestivum* L.). Biol. Fertil. Soils, nr. 13, p.165-172.

Chun, S.S, Vattem, D.A., Lin, Y.T., Shetty, K., 2005, Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*, *Process Biochemistry*, vol., 40, nr. 2. p. 809-816.

Ciobanu, I., 1971, *Morfologia plantelor*. Editura Didactică şi Pedagogică Bucureşti.

Clark, M.F., Adams, A.N., 1977, Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorben assay for detection of plant viruses. J. of Gen. Virol., nr. 34, p. 475-483.

Clark, M., Adams, A.N., Tresh, J.M., Casper, R., 1976, The detection of plum pox and other viruses in woody plants by emzime linked immunosorbent assay (ELISA). Acta Horticult., nr. 76, p. 51-57.

Constabel, F., 1957, Ernährungsphysiologische und manometrische Untersuchungen zur Gewebekultur der *Gymnosporangium*-Gallen von *Juniperus*-Arten. Biol. *Zentralbl.*, nr. 76, p. 385-413.

Converse, R.H., 1966, Effect of heat treatment on the raspberry mosaic virus complex in Latham red raspberry. Phytopathology, nr. 56, p. 556-559.

Converse, R.H., 1970, Virus and viruslike diseases of raspberry and blackberry. In: *Virus Diseases of Small Fruits and Grapevine*, Frazier, N.W. (Edt.), Sect. 3, Berkeley Univ. California, p. 107-110.

Crèvecoeur, M., Kevers, C. Gaspar, Th. 1987, A comparative biochemical and cytological characterization of normal and habituated sugarbeet calli. Biol. Plant., nr. 29, p. 1-6.

Crèvecoeur, M., Hagège, D., Catesson, A.M., Greppin, H., Gaspar, Th., 1992, Ultrastructural characteristics of cells from normal and habituated sugar beet calli. Plant Physiol Biochem., nr. 30, p. 87-95.

Curtis, R., Cardineau, G.A., Oral immunization by transgenic plants, USA Patent nr. 5.679.880.

Cutter, V.M.J, 1951, The isolation of plant rusts upon artificial media and some speculations on the metabolism of obligate plant parasites. Trans. N.Y. Acad. Sci., nr. 14, p. 103-109.

Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H., 1994, Antioxidants constituents in sage (*Salvia officinalis*), Journal Agric Food Chem, nr. 42, p. 665-669.

Czosnowski, J., 1952, Charakterystyka fizjoligiczna trzech typow tkanek *Vitis vinifera*: normalenej, tumora bakteryjnego (crown-gall) i tumora chemicznego hodowanych *in vitro*. *Poznanskie towarzystwo przyjaciól nauk, Prace Kom. Biol.*, nr. 13, p.189.

Daguin, F., Letouzé, R., 1985, Relations entre hypolignification et ètat vitreux chez *Salix Babylonica* en culture in vitro. Röle de la nutrition ammoniacale. Can J Bot., nr. 63, p. 324-326.

Daguin, F., Letouzé, R., 1986, Ammonium-induced vitrification in cultured tissues. Physiol Plant., nr. 66, p. 94-98.

Damiano, C., Monticelli, S., 1998, *In vitro* fruit trees rooting by *Agrobacterium rhizogenes* wild type infection. E J. B. Electronic Journal of Biotechnology, vol. 1, nr. 3, p. 1-6.

David, C., Tempé, J., 1985, Le crown gall et le hairy root: deux exemples de manipulations génétiques naturelles a l'origine de phénomènes de prolifération chez les plantes. Bull. Soc. Bot. Fr., nr. 132, Actual. Bot., p. 75-83.

Davis, M.J., Baker R., Hanan J.J., 1977, Clonal multiplication of carnation by micropropagation. J Am. Soc. Hortic. Sci., nr. 102, p. 48-53.

Davis, R.E., Whitcomb, R.F., 1971, Mycoplasmus, Rickettsiae, and Chlamydiae: possible relation to yellows diseases and other disorders of plants and insects. Ann. Rev. Plant. Path., nr. 9, p. 119-154.

Deans, S.G., Ritchie, G., 1987, Antibacterial properties of plant essential oils. În: J. Food Micrbiol, nr. 5, p. 165-180.

Debergh, P.C., 1983. Effect of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiol. Plant., nr. 59, p. 270-276.

Debergh, P.C., 1987, Improving micropropagation, IAPTC Newsletter, nr. 51, p. 2-10.

Debergh, P.C., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R., Ziv, M., 1992, Reconsideration of the term *vitrification* as used in micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Culture, nr. 30, p. 140-165.

Debergh, P.C., Harbaoui, Y., Lemeur, R., 1981, Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*), Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. Physiol. Plant., nr. 53, p. 181-187.

Debergh, P.C., Maene L.J., 1984, Preparation of tissue cultured plants for rooting and establishment *in vivo*. In: Proc. Int. Symp. Plant. Tissue Cell. Cult. Applic. Crop Improv. Eds. Novak, F.J., Havel, T., Dolezel, K., Czechoslovakia Acad. Sci., Prague, p. 487-495.

Declerk, S., Risede, J.M., Delvaux, B., 2002, Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with in vitro monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. Scientia Horticulturae, vol. 93, nr. 3-4, p. 301-309.

De Greef, W., Jacobs, M. 1979, *In vitro* culture of sugarbeet: description of a cell line with high regeneration capacity. Plant Sci. Lett., nr. 17, p. 55-61.

BCU CLUJ-NAPOCA BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Delarue, M., Santoni, V., Caboche, M., Bellini, C., 1997, Cristal mutations in *Arabidopsis* conifer a genetically heritable, recessive, hyperhydric phenotype. Planta, vol. 1, nr. 202, p. 51-61.

Deliu, C., Halmágy A., 2008, Embriogeneza somatică. (Edt.) Todesco, Cluj-Napoca.

Delis, M., Garbaczewska, G., Niemirowicz-Szczytt, K., 2005, Differentiation of adventitious buds from *Capsicum annuum* L. hypocotyls after co-culture with *Agrobacterium timefaciens*. Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica 47/1, p.193-198.

Démétriadès, S.D., 1953, Essais de culture *in vitro* des tissus des galles du *Salvia pomifera* L. *Ann. Inst. Phytopath. Benaki*, nr. 7, p.61.

Dencso, I., 1987, Factors influencing vitrification of carnation and conifers, Acta Horic., nr. 212, p. 167-176.

Deogratias, J.M., 1987, Utilisation de la culture *in vitro* en vue de l'élimination des virus NRSV, PDV et CLSV chez le cerisier (*Prunus avium* L.) Thèse. Université de Bordeaux (France), 184 p.

Deogratias, J.M., Lutz, A., Dosba, F., 1985, Microgreffage d'apex de cerisiers (*Prunus avium* L.) multipliés *in vitro* en vue de l'elimination de trois types de particules virales (CLSV, PDV, et NRSV). 5ème *Colloque sur les recherches fruitièrs*, Bordeaux (France), 13-14 novembre 1985, p. 85-96.

De Proft, M., Maene, J., Debergh, P., 1985, Carbon dioxide and ethylene evolution in the culture atmosphere of magnolia cultured *in vitro*. Physiol. Plant., nr. 65, p. 375-379.

De Proft, M.P., Van de Broek G., de Greef J.A., 1987, Invalvement of ethylene on senescence and vitrification of in vitro cultured miniroses. Acta Horic., nr. 212, p. 217-222.

De Ropp, R,S., 1946, Studies in the physiology of leaf growth. II: Growth and structure of the first leaf of rye when cultivated in isolation or attached to the intact plant. Ann. Bot., nr. 9, p. 31-40.

De Ropp, R.S., 1947a, The isolation and behviour of bacteria-free crown-gall tissue from primary galls of *Helianthus annuus*. *Phytopathol.*, nr. 37, p. 201-206.

De Ropp, R.S., 1947b, The response of normal plant tissues and of crown-gall tumor tissues to synthetic growth hormones. *Amer. Jour. Bot.*, nr. 34, p. 53-62.

Derrick, K.S., 1973, Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. Virologi, nr. 56, p. 652-653.

Dhawan, V., Bhojwani, S.S., 1987, Hardening *in vitro* and morpho-physiological changes in the leaves during acclimatization of micropropagated plants of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. Plant Science, nr. 53, p. 65-72.

Dianzani, M.V., 1989, Lipid peroxidation and cancer: A critical reconsideration. Tumori, nr. 75, p. 351-357.

Dillen, W., Buysens, S., 1989, A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata*. Plant Cell Tiss. Organ Cult., nr. 19, p. 181-188.

Dixon, R.A., Fuller, K.W., 1976, Effects of synthetic auxin levels on phaseollin production and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity in tissue cultures of *Phaseolus vulgaris* L. Physiological Plant Pathology, nr. 9, p. 299-312.

Dőbereiner, J., Day, J.M., Dart, P., 1972, Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Pasapalum notatum – Azotobacter* paspali association. J. Gen. Microbiol. nr. 71, p. 103-116.

Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., Asuyama, H., 1967, Mycoplasma – or PLT group – like microorganisms found in the phloem elements of plant infected with mulberry dwarf,

potato witches broom, aster yellows, or *Paulownia* witches'broom. Ann. Phytopath. Soc. Japan, nr. 33, p. 259-266.

Doorenboos, J., 1953, Rejuvenation of *Hedera helix* in graft combinations, Prev., Wageningen, p. 115.

Douds, D.D., 1997, A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA-transformed carrot toots. Mycorriza, vol. 7, nr. 2, p. 57-61.

Dreyfus, B., Garcia, L., Gillis, M., 1988, Characterization of *Azorhizobillm caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata.* Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 38, p. 89-98.

Druart, P.H., Boxus, P.H., Liard, O., Delaite, B., 1981, La micropropagation du Merisier à partir de la culture de méristème. In: Proc IUFRO Sect S2 01 5. *Int. Workshop in Vitro Cultivation for Tree Species*, Fontainebleau, France, p. 101-108.

Druart, P.H., Pâques, M., Boxus, P.H., 1984, Morphologie anormale semblable aux symptomes de vitrification rencontres au cours de la micropropagation de *P. glaudulosa* Thurn. var. *sinensis*. Influence de l'AVG, de L'AIBA et d'$AgNO_3$. Arch Int Physiol Biochim, vol. 92, nr. 1, p. 22-23.

Dunez, J., Monson, M., 1968, Possibilités de régenération des chrysanthèmes contaminés par les virus de l'aspermie et de la mosaique. Ann. Epiph., nr. 19, p. 165-175.

Eguchi, Y., Curtis, O.F., Shetty, K., 1996, Interaction of hyperhydricity-preventing *Pseudomonas* sp. with oregano (*Origanum vulgare*) and selection of high phenolics and rosmarinic acid-producing clonal lines. Food Biotechnol, nr. 10, p. 191-202.

Elmeskaoui, A., Damont, J., Poulin, M., Piche, Y., Desjardins, Y., 1995, A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets *in vitro.* Mycorrhiza, vol. 5, p. 313-319.

Endress, R., 1994, *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin.

Enescu, V., Ioniță, L., Palada-Nicolau, M., 1994, Înmulțirea vegetativă a arborilor forestireri. Metode neconvenționale. Culturi de țesuturi in vitro. (Edt.) Ceres, București.

Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.P., Holsters, M., Seurinck, J. Silva, B., Van, Vilet, F., Villarroel, R., 1979, Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens*, the TI-plasmid and the plant host. Proc. R.Soc. Lond B., nr. 204, p. 251-266.

Fal, M.A., Majada, J.P., Gonzales, A., Sanchez-Tames, R., 1999, Differences between *Dianthus caryophyllus* L. Cultivars in *in vitro* growth and morphogenesis are related to their ethylene production. Plant Growth Regul., nr. 27, p. 131-136.

Fallot, J., 1958, Induction, par *Bacillus megaterium*, de la prolifération *in vitro* des tissus de tiges de Vitis rupestris, prélevées, pendant la période de repos végétatif. C.R. Acad. Sci., Paris, nr. 246, p. 295.

Fontes, M.A., Otoni, W.C., Carolino, S.M.B., 1999, Brommonschenkel S.H., Fontes E.P.B., Fári M., Louro R.P., Hyperhydricity in pepper plants regenerated in vitro: involvement of Bip (Binding Protein) and ultrastructural aspects. Plant Cell Reports, vol. 19, nr. 1, p. 81-87.

Franck, Th., Crèvecoeur, M., Wuest, J., Greppin, H., Gaspar, T., 1997, Cytological comparison of leaves and stems of *Prunus avium* L. shoots cultured on a solid medium with agar or Gerlite. Biotechnic & Histochemistry, vol. 73, nr. 1, p. 32-43.

Franck, Th., Kevers, C., Gaspar, Th., 1995, Protective enzymatic systems against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L.L. raised *in vitro*. Plant Growth Regul, vol. 16, p. 253-256.

BCU CLUJ-NAPOCA LIBRARY

Franck T., Kevers C., Gaspar T., Dommes J., Deby C., Greimers R., Serteyn D., Deby-Dupont G., 2004, Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelrite: a controlled stress response. Plant Physiology and Biochemistry, vol. 6, nr. 42, p. 519-527.

Franclet, A., 1979, Rajeunissement des arbres adultes en vue leur propagation végétative. In: *Micropropagation des arbres forestiers*, AFOCEL. Etudes et Recherches, p. 3-18.

Franclet, A., 1980, Rajeunissement et propagation végétative des ligneux. Ann. rech. sylv. AFOCEL, p. 4-40.

Franclet, A., 1991, Biotechnology in „rejuvenation": hope for the micropropagation of difficult woody plants. ActaHort ., 289, p. 273-282.

Frey, L., Janick,J., 1991, Organogenesis in carnation. J. Am. Soc. Hort. Sci., nr. 116, p. 1108-1112.

Frommel, M., Nowak, J., Lazarovits, G., 1991, Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.*, nr. 96, p. 928-936.

Fukuda, H., Komamine, A., 1985, Cytodifferentiation. In: *Cell Culture and somatic cell genetics of plants*, (Ed.coord.) Vasil IK, (Edt.) Academic Press, nr. 2, New York, p. 149-212.

Gaspar, T.H., 1986, Integrated relationships of biochemical and physiological peroxidase activities, În: *Molecular and physiological aspects of plant peroxidases*, (Ed.coord.). Greppin H., Penel C., Gaspar T.H., Univ Geneva, Switzerland, p. 455-468.

Gaspar, T., 1991, Vitrification in micropropagation. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 17. *High-Tech and Micropropagation* I, (Ed.coord.) Bajaj, Y.P.S. (Edt). Springer-Verlag, Berlin, p. 117-126.

Gaspar, T., 1995, The concept of cancer in „in vitro" plant culture and the implication of habituation to hormones and hyperhydricity. Plant Tissue Culture and Biotechnology, vol. 1, nr. 3. p. 126-136.

Gaspar, T., 1998, Plants can get cancer. Plant Physiol. Biochem, nr. 36, p. 203-204.

Gaspar, T.H., Kevers, C., 1985, Cobalt prevention of vitrification process in carnation. Plant Physiology, vol. 3, nr. 77, p. 14-19.

Gaspar, T., Bisbis, B., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Le Dily, F., Billard, J.P., Huault, C., Garnier, F., Rideau, M., Foidart, J.M., 1998, Atypical metabolisms and biochemical cycles imposing the cancerous state on plant cells. În: *Plant Growth Regulation*, Kluwer Academic Publishers, 24, p. 135-144.

Gaspar, T., Hagège, D., Kevers, C., Penel, C., Crèvecoeur, M., Engelmann, I., Greppin, H., Foidart, J.M., 1991, When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. Physiol. Plant, nr. 83, p. 196-701.

Gaspar, T., Hagège, D., Penel, C., Foidart, J.M., Greppin, H., 1992a, Peroxidases and plant cancer in the absence of pathogens. In: *Plant Peroxidases 1980-1990. Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects*, (Ed.coord.) Penel, C., Gaspar, T., Greppin, H., (Edt) Switzerland, Univ. of Genève, p. 125-137.

Gaspar, T.H., Kevers, C., Bouillenne, H., Maziere, Y., Barbe, J.P., 1989, Ethylene production in relation to rose micropropagation through axillary budding, Eds. Clijsters H., *Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and highter plants*, Kluwer Acad, Dorbrecht, p. 303-312.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., 1983, Auxin control of calcium-mediated peroxidase secretion by auxin-dependent and auxin-independent sugarbeet cells. Phytochemistry 22, p. 2657-2660.

Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Crèvecoeur, M., Greppin, H., 1988, Biochemical characterization of normal and habituated sugaebeet calli. Relationshit with anatomy, habituation and organogenesis. Postdamer Forsch 57 B, p. 21-30.

Gaspar, T., Kevers, C., Bisbis, B., Crevècoeur, M., Penel, C., Greppin, H., Le Dily, F., Billard, J.P., Haualt, C., Foidart, J.M., 1995, Cancer végétal *in vitro*: aspects morphogénétiques et biochimiques. In: *Quel Avenir por l'Amélioration des Plantes* (Ed.coord.), Demarly, Y., Dubois, J. (Edt.) AUPELF-UREF, Paris: John Libbey Eurotext, p. 165-171.

Gaspar, T., Kevers, C., Crevècoeur, M., Penel, C., Foidart, J.M., Greppin, H., 1992b, Habituation and vitrification of plants cultured *in vitro*: a reciprocal relationship. Wiss. Zeitschr. Humboldt-Univ. Berlin, Mathem./Naturwiss, vol. 41, nr. 3, p. 35-40.

Gaspar, T., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M., Boxus, P., 1987, Vitrification: morphological, physiological, and ecological aspects. In: *Cell and Tisse Culture in Forestry*. Vol. 1. *General Principles and Bitechnology*, (Ed.coord.) Bonga, J.M., and Durzan, D.J. (Edt.), Dordrecht Martinus Nijhoff Publ. p. 152-166.

Gaspar, T., Kevers, C., Franck, T., Bisbis, B., Billard, J.P., Huault, C., Le Dily, F., Petit-Paly, G., Rideau, M., Penel,C., Crèvecouer, M., Greppin, H., 1995a, Paradoxical results in the analysis of hyperhydric tissues considered as being under stress: questions for a debate. Bulg. J. Plant Physiol., vol. 21 nr. 2-3, p. 80-97.

Gaspar, T., Penel, C., Greppin, H., Foidart, J.M., 1994, Plant cancer at the cell and organismic level, in the absence of pathogens, and the resulting loss of organogenic totipotency. Saussurea, nr. 25, p. 63-68.

Gautheret, R.J., 1942, Hétéro-auxines et cultures se tissus végétaux. *Bull. Soc. Chem. Biol., Paris* 24, p. 13-46.

Gautheret, R.J., 1946a, Comparaison entre l'action de l'acide indole-accétique et celle du *Phytomonas tumifaciens* sur la croissance des tissus végétaux. *C.R. Soc. Biol., Paris* 140, p. 169.

Gautheret, R.J., 1946b, Growth without roots. *Science News Letter, 50*, p. 157.

Gautheret, R.J., 1947a, Action du *pH* sur le développement des cultures de tissus de Carotte. C.R. Soc. Biol., 141, p. 25-28.

Gautheret, R.J., 1947b, Action de l'acide indole-acétique sur le developpement des tissus normaux et des tissus de crown-gall de Topinambour cultivés in vitro. *C.R. Ac. Sc.*, nr. 224, p. 1728-1730.

Gautheret, R.J., 1947c, Comparasion entre la structure des cultures de tissus normaux et des cultures de tissus de crown-gall de Topinambour. *C.R. Soc. Biol.*, nr. 141, p. 598-601.

Gautheret, R.J., 1948, Sur la culture de trois types de tissus de *Scorsonère*: tissus normaux, tissus de crown-gall et tissus accoutumés à l'hétéro-auxine. *C.R. Ac. Sc.*, nr. 226, p. 270-271.

Gautheret, R.J., 1959, *La culture des tissus végétaux, technique et réalisations*. Masson, Paris.

Gautheret R.J., 1977, *La culture des tissus et des cellules des végétaux. Résultants généraux et rèalisations pratiques*. Travaux dédiés à la memoire de Georges Morel, Masson, Paris.

Gautheret, R., 1980, Les transformations tumorales chez les végétaux.Bull. Acad. Nat. Méd., 164, p. 358-374.

Gay, G., 1992, Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma hiemale* on adventitious root formation in de-rooted *Pinus halelensis* shoot hypocotyls. Can. J. Bot. 68, p. 1265-1270.

Gay, G., Bartschi, H., Grange, O.,1992, Ectomycorrhizal fungi as a tool to enhance rooting of micropropagated cuttings. In: *Micropropagation, root regeneration, and mycorrhizas*. Joint meeting between COST 87 and COST 8.10, Dijon, France, p. 43.

Gay, G., Normand, L., Marmeisse R., Sotta, B., Debaud, J.C., 1994, Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi have increased mycorrhizal activity. New Phytol. 121, p.645-657.

George, E.F., 1996, *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part. 2. In Practice 2nd Ed. cap 13, (Edt.) Exegetics Limited, Edington, p. 639-669.

Gersani, M., Leshem, B, Sachs, T., 1986, Impaired polarity in abnormal plant development. J Plant Physiol, nr. 123, p. 91-95.

Gibson, A.H., Child, J.J., Pagan, J.D., Scowcroft, W.R., 1976, The induction of nitrogenase activity in *Rhizobium* by non-legume plant cells. Planta, nr. 128, p. 233-239.

Gille, T., 1991, Chromosome variability in callus produced plants. In: *Genetics and Breeding of Ornamental Species*, (Ed.coord.) Harding J, Singh F & Mol JNM, (Edt.) Kluwere Academic Publishers, Dordrecht, p. 79-106.

Gioelli, F., 1938, Morfologia, istologia, fisiologia e fisiopatologia di meristemi secondari *in vitro*. *Att. Ac. Sc. Ferara*, 16, p. 1-87.

Giusti, P., Vitti, D., Fiocchetti, F., Colla, G., Saccardo, F., Tucci, M., 2002, In vitro propagation of three endangered cactus species. Scientia Horticulturae, vol. 4, nr. 95, p. 319-332.

Glagoleva, O.B., Kovalskaya, N.U., Umarov, M.M., 1996, Endosymbiosis formation between nitrogen fixing bacteria *Pseudomonas caryophylli* and rape cells. Endocytobiosis Cell. Hes., vol. II, p. 147-158.

Glagoleva, O.B., Kovalskaya, N.U., Kireev, I.I., Lohakova, E.S., Umarov, M.M., 1997, Para-nodulation of rape upon inoculation with nitrogen-fixing rhizosphere bacteria. Microbiology 66, p. 455-460.

Grange, O., Bartschi, H., Gay, G., 1997, Effect of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrospermum* on *in vitro* rooting of micropropagated cuttings of arbuscular mycorrhiza-forming *Prunus avium* and *Prunus cerasus*. Trees Struct. Funct. 12, p. 49-56.

Grayer, R.J., Harbone, J.B., 1994, A survey of antifungal compounds from higer plants 1982-1993. Phytochem, nr. 37, p. 19-42.

Grout, B.W.W., Aston, M.J., 1977, Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Hort. Res., 17, p. 1-7.

Grout, B.W.W., Aston, H., 1978, Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. Ann. Bot. 42, p. 993-995.

Guja, C., 2000, Aurele Corpurilor. Interfețe cu cosmosul., vol. I, Aura este semnul iluminării. (Edt.) Polirom, București.

Guja, C., 2000, Aura corpului uman. Introducere în antropologia individului. vol. II, Aura este amprenta materiei., (Edt.) Polirom, București.

Gusev, M.V., Korzhenevskaya, T.G., Pyvovarova, L.V., Baulina, O.I., Butenko, R.G., 1986, Introduction of a nitrogen-fixing cyanobacterium into tobacco shoot regenerates. Planta 167, p. 1-8.

György, B., 1983, Inhibiting and stimulating effects of plant substances on virus transmission. Acta Horticult., 130, p. 99-106.

Gyurján, I., Korányi, P., Preininger, E., Varga, Sz.S., Paless. Gy., 1995, Artificial plant-azotobacter symbiosis for atmospheric nitrogen fixation. In: *Azospirillum VI and related microorganisms*. (Ed.coord.) *Fendrik, I., del Gallo, M., Vanderleyden, J., Zamaroczy, M.*, (Edt.), NATO ASI Series, Series G. "Ecological Sciences", vol. 37. Berlin, Heidelberg, New York: Springer- Verlag, p. 401-413.

Hagège, D., 1993, *Plant Physiol. Biochem*. 31, p. 621-629.

Hagège, D., 1996, Habituation în sugarbeet plant cells: permanent stress or antioxidant adaptative strategy? In vitro Cell Dev Biol Plant, nr. 32, p. 1-5.

Hagège, D., Boucaud, J., Foidart, J.M., Crèvecoeur, M., Greppin, H., Gaspar, T., 1990a, The auxin- and cytokinin-habituated sugarbeet callus as neoplasic disease. Arch. Int. Physiol. Biochim., nr. 98. p. 41.

Hagège, D., Kevers, C., Boucaud, J., Duyme, M., Gaspar, T., 1990b, Polyamines phospholipids, and peroxides in normal and habituated sugarbeet calli. J. Plant. Physiol, nr. 136, p. 641-645.

Hagège, D., Catania, R., Micalef, H., Gaspar, Th., 1992a, Nuclear shape and DNA content of fully habituated nonorganogenic sugarbeet cells. Protoplasma, nr. 166, p. 49-54.

Hagège, D., Deby, C., Kevers, C., Foidart, J.M., Gaspar, Th., 1993, Anti-lipoperoxidant potential of the fully habituated nonorganogenic sugarbeet callus. Arch Intern Physiol Biochim Biophy, nr. 101, p. 9.

Hagège, D., Kevers, C., Penel, C., Crèvecoeur, M., Engelmann, I., Grepin, H., Foidart, J.M., 1991c, When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. Physiol Plant, nr. 83, p. 696-701.

Hagège, D., Kevers, C., Crèvecoeur, M., Penel, C., Foidart, J.M., Grepin, H., 1992b, Habituation and vitrification of plants *in vitro*: A reciprocal relationship. – Wiss. Z. Humbolt-Univ. Berlin math.-Naturwiss. Reihe, nr. 41. p. 35-40.

Hagège, D., Kevers, C., Crèvecoeur, M., Thollier, M.T., Monties, B., Gaspar, T., 1991a, Peroxidases, growth and differentiation of habituated sugarbeet cells. In: *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. (Ed.coord.) Lobarszewski, J., Greppin, H., Penel, C., Gaspar, T., (Edt), University of Geneva Publisher, 2, p. 281-290.

Hagège, D., Kevers, C., Gaspar, T., 1991b, A comparison between ethzlene production, ACC and m-ACC contents and hydroperoxide level in normal and habituated sugar beet calli. – Physiol. Plant. 82, p. 397-400.

Hagège, D., Kevers, C., Gaspar, T., Thorpe, T.A., 1991c, Abnormal growth of habituated sugarbeet callus and cell suspensions. *In Vitro* Cell Dev. Biol. 27P, p. 112-116.

Hagège, D., Kevers, C., Le Dily, F., Gaspar, T., Boucaud, J., 1990c, NaCl dependent growth rate of normal and habituated sugarbeet calli, ethylene production and peroxidase activity. C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III 310, p. 259-264.

Hagège, D., Nouvelot, A., Boucaud, J., Gaspar, T., 1990d, Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts:avoidance of pigment interference. Phytochem Anal. I, p. 86-89.

Hagège, D., Kevers, C., Salabert, Ph., Gaspar, T., 1992, Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated nonorganogenic sugarbeet calluses. In Vitro Cell Dev Biol 28P, p. 143-147.

Hagège, D., Kevers, C., Genus, J., Gaspar, T.,1994, Ethylene production and polyamine content of fully habituated sugarbeet calli. J. Plant Physiol, nr. 143, p. 722-725.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Hakkaart, F.A., Versluijs, J.M.A., 1983, Control of leaf curl and *Xanthomonas begoniae* in Begonia "Elatior" by meristem culture and isolation test. Acta Hort., nr. 131, p. 299-301.

Hale, S.A., Young, R.E., Adelberg, J.W., Keese, R.J., Camper, N.D., 1992, Bioreactor development for continual-flow, liquid plant tissue. Acta Hort., nr. 319, p. 107-112.

Hammerschnidt, R., 1999, Phytoalexins: What have we learned after 60 years? Annu. Rev. Phytopathol., nr. 37, p. 285-306.

Hansen, A.J., Green, L., 1983, Potential of ribavirin for tree fruit virus inhibition. Acta Hort., nr. 130, p. 183-184.

Hauzinska, E., 1974, L'organogenèse dans le tissu de cal de l'oeillet (*Dianthus caryophyllus* L.) dans les conditions de culture *in vitro*. In: Proc 19th Hortic Congr. Warsaw 1A, p. 60.

Hegedus P., Phan C.T., 1987, Activities of five enzymes of the phenolic metabolism on rooted and acclimated vitreous plats in relation with phenolic treatments. Acta Hortic, nr. 212, p. 211-216.

Heim, J.M., Gries, G.A., 1953, The culture of Erysiphe *cichoracearum* on sunflower tumor tissue. *Phytopathology*, nr. 43, p. 343,344.

Heller, R., 1953, Rechercher sur la nutrition minerale des tissues vegetaux cultives *in vitro*. Ann Sci Nat Bot Biol Veg nr. 14, p. 1-223.

Heller, R., 1954, Les besoins minéraux des tissus en culture. Ann. Biol., nr. 30, p. 261-281.

Heller, R., 1969, *Biologie Végétale II. Nutrition et metabolisme*. Masson et Cie, Paris, p. 415-424.

Henderson, J.H.M., 1954, The changing nutritional pattern from normal to habituated sunflower callus tissue in vitro. Ann. Biol., nr. 30, p. 329-348.

Herman, E.B., 1992a, Loss of virus from TMV infected callus. Agricell Report, vol. 19, nr. 2, p. 10.

Herman, E.B., 1992b, Fusion with *Agrobacterium* restores ability of long-term cell cultures to differentiate. Agricell Report, vol. 28, nr. 2, p. 10.

Herman, E.B., 1992c, Bacteria stimulate *in vitro* embryogenesis and rooting. *Agrobacterium* improves rooting of transgenic potato plants. Agricell Report, vol. 28, nr. 2, p. 13.

Herman, E.B., 1994, Rooting improvement via treatment with *Agrobacterium rhizogenes*. Agricell Report, vol. 22, nr. 1, p. 3.

Herman, E.B., 1994a, Acclimatization and hyperhydricity (vitrification) of micropropagules. Agricell Report, vol. 23, nr. 1, p.3.

Herman, E.B., 1994b, Agar fragments prevent hyperhydricity in liquid medium. Agricell Report, vol. 23, nr. 4, p. 29.

Herman, E.B., 1994c, Cocultivation with *Bacillus* promotes geranium somatic embriogenesis. Agricell Report, vol. 23, nr. 5, p. 34-35.

Herman, E.B., 1995, Mycorrhizal fungus confers nematode-resistance to quince rootstock. Agricell Report, vol. 25, nr. 1, p. 5.

Herman, E.B., 1995a, Picolinic acid induces direct somatic embryogenesis in hyperhydric sweet potato shoots., Agricell Report, vol. 25, nr. 2, p. 4.

Herman, E.B., 1996, New explication for hyperhydricity – related desiccation of plantlets. Agricell Report, vol. 27, nr. 3, p. 18.

Herman, E.B., 1996a, Rabies virus coat protein produced by transgenic tomatoes. Agricell Report, vol. 26, nr. 1, p. 1.

BCU CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Herman, E.B., 1996b, Edible vaccines via plant Biotechnology. Agricell Report, vol. 27, nr. 1, p. 2.

Herman, E.B., 1996c, Virus elimination via electrotherapy and shoot-tip culture. Agricell Report, vol. 27, nr. 4, p. 25-30.

Herman, E.B., 1996d, *Special Meeting Issue: International Symposium on Bacterial and Bacteria – Like Contamiants of Plant Tissue Cultures*. Agricell Report, vol. 27, nr. 4, p. 25-30.

Herman, E.B., 1996e, Latent contamination of plant tissue cultures. Agricell Report, vol. 27, nr. 4, p. 27.

Herman, E.B., 1996f, Beneficial effects of bacteria and fungi on plant tissue cultures, Agricell Report, vol. 27, nr. 6, p. 26.

Herman, E.B., 1996g, Mycorrhizae improve rooting of larch micropropagationes. Agricell Report, vol. 26, nr. 4, p. 13.

Herman, E.B., 1996h, Bacterium prevents hyperhydricity in cocultured *Oregano* shoots. Agricell Report, vol. 26, nr. 5, p.33.

Herman, E.B., 1996i, Starch-gelled medium improves *in vitro* shoot proliferation. Agricell Report, vol 26, nr. 6, p. 45.

Herman, E.B., 1997, Carrageenan stabilizes pH and prevents hyperhydricity. Agricell Report, vol. 28, nr. 6, p. 43.

Herman, E.B., 1997a, Fusion with *Agrobacterium* restores ability of long-term cell cultures to differetiate. Agricell Report, vol. 28, nr. 20, p. 10.

Herman, E.B., 1997b, *Agrobacterium* improves rooting of transgenic potato plant. Agricell Report, vol. 28, nr. 3, p. 13.

Herman, E.B., 1997c, Coculture with bacteria (bacterization) promotes *in vitro* plant growth. Agricell Report, vol. 28, nr. 6, p. 42.

Herman, E.B., 1997d, Hyperhydricity controls medium composition and subculture generation. Agricell Report, vol. 29, nr. 5,p. 36.

Herman, E.B., 1997e, Fluorocarbon polymer film prevents hyperhydricity in woody plant tissue cultures., Agricell Report, vol. 28, nr. 6, p. 43.

Herman, E.B., 1998a, New applications of plant genetic engineering. Oral vaccine from transgenic potato plants. Agricel Report, vol. 30, nr. 2, p. 9.

Herman, E.B., 1998b, Persistence of bacterial contamination in „asepticaly micropropagated" cherry trees. Agricell Report, vol. 31, nr. 1, p. 43.

Herman, E.B., 1998c, Potential use of rol genes for plant improvement and micropropagation. Agricell Report, vol. 31, nr. 1, p. 43.

Herman, E.B., 1998d, REDBIO `98 – 3rd Latin American Meeting on Plant Biotechnology. Havana, Cuba. Agricell Report, vol. 31, nr. 2, p. 12.

Herman, E.B., 1998e, Advaces in regeneration and micropropagation. *Verticlillum* resistence via in vitro bacteriyation tomato plantlets. Agricell Report, vol. 31, nr. 4, p. 26.

Herman, E.B., 1998f, Micropropagation under non-sterile conditions. Agricell Report, vol. 31, nr. 5, p. 33.

Herman, E.B., 1998g, Promotive effect of coculturing plantlets with microorganism *in vitro*. Agricell Report, vol. 31, nr. 5, p. 34.

Herman, E.B., 1998h, Beneficial effects of mycorrhizal fungi on micropropagated plants. Agricell Report, vol. 30, nr. 3, p.19.

Herman, E.B., 1998i, Control of hyperhydricity in liquid micropropagation systems. Agricell Report, vol. 30, nr. 4, p 22.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Herman, E.B., 1998j, Rare-earth elements promate tissue culture of *Zanthoxylum bungeanum*, Agricell Report, vol. 31, nr. 5, p. 36.
Herman, E.B., 1999, *In vitro* bacterization stimulates rooting and verticillum wilt resistance. Agricell Report, vol. 32, nr. 3, p. 79-80.
Herman, E.B., 2000, Control of hyperhydricity using fish protein hydrolysates. Agricell Report, vol. 34, nr. 3, p. 19.
Herman, E.B., 2000a, Inoculation with *Agrobacterium* improves woody plant micropropagation. Agricell Report, vol. 34, nr. 1, p. 2.
Herman, E.B., 2000b, „Electrotheraphy" technique eliminates viral and bacterial infections. Agricell Report, vol. 34, nr. 2, p. 9.
Herman, E.B., 2000c, Control of secondary metabolite synthesis by hair-root *rol* genes. Agricell Report, vol. 34, nr. 2, p. 11.
Herman, E.B., 2000d, Bacterization improves survival of micropropagated tea plants. Agricell Report, vol. 35, nr. 6, p. 21-22.
Herman, E.B., 2001, *Methylotrophic* bacteria promote *in vitro* growth and morphogenesis. Agricell Report, vol. 37, nr. 5, p. 33-34.
Herman, E.B., 2001a, Ancymidol – induced hyperhydricity: a tool for micropropagation. Agricell Report, vol. 37, nr. 4, p. 27.
Herman, E.B., 2002, Mycorrhizal fungi: in vitro applications and mechanisms of action. Agricell Report, vol. 38, nr. 5, p.34.
Herman, E.B., 2003, Is hyperhydricity caused by abnormal DNA?. Agricell Report, vol. 40, nr. 3, p. 18.
Herman, E.B., 2003a, Cryopreservation eliminates grapevine virus. Agricell Report, vol. 41, nr. 1, p. 5.
Herman, E.B., 2004, Ethylene scrubber eliminates hyperhydricity in potato micropropagation., Agricell Report vol. 42, nr. 2, p. 9.
Herman, E.B., 2004a, Biotization improves quality of micropropagated Artichoke and Raspberry. Agricell Report, vol. 42, nr. 2, p. 37.
Herman, E.B., 2005, High *ex vitro* CO_2 permits establishment of hyperhydric plants in soil. Agricell Report, vol. 44, nr. 5, p. 5
Herman, E.B., 2005a, Pharmaceutical products from in vitrocultures. Anti-hepatitis B extract. Agricell Report, vol. 44, nr. 2, p. 30.
Herman, E.B., 2005b, Bacteria stimulate organogenesis in tissue-cultured sunflower. Agricell Report, vol. 44, nr. 6, p. 41-42.
Herman, E.B., 2005c, Methylobacteria promote *in vitro* sunflower shoot and root production. Agricell Report, vol. 45, nr. 3, p. 17-18.
Herman, E.B., 2005d, Control of vitropathic contaminants in plant tissue cultures. Agricell Report, vol. 45, nr. 5, p. 33-34.
Herman, E.B., 2005e, Bacillus promotes growth, development and survival of *Chrysanthemum*. Agricell Report, vol. 45, nr. 5, p. 35.
Herman, E.,B., 2005f, Genetic engineering of plants by non-*Agrobacterium* bacteria. Agricell Report, vol. 45, nr. 5, p. 47.
Herman, E.B., 2006, Sodium alginat a possible antivitrification agent. Agricell Report, vol. 46, nr. 1, p. 2.
Herman, E.B., 2006a, Inoculation with mycorrizae and bacteria improves micropropagation. Agricell Report, vol. 46, nr. 6, p. 42.
Herman, E.B., 2006b, Methylobacterium stimulates development of *in vitro*-cultured rice. Agricell Report, vol. 46, nr. 1, p. 1.

POLITEHNICA UNIVERSITY LIBRARY

Herman, E.B., 2006c, Virus-free plants from root meristems. Agricell Report, t. 47, nr. 3, p. 18.

Herman, E.B., 2006d, Endogenous bacteria in explants: tissue culture problems and potential. Agricell Report, vol. 46, nr. 2, p. 9-11.

Herman, E.B., 2007, Rare earth elements reduce hyperhydricity in maca, Agricel Report, vol. 49, nr. 6, p. 44.

Herman, E.B., 2007a, Bacterization stimulated isoflavone yeld by A. *kalkora* root cultures. Agricell Rep., vol. 48, nr. 3, p. 17.

Herman, E.B., 2007b, Survival, detection, and elimination of viruses in plant tissue cultures. Agricell Report, vol. 48, nr. 6, p. 43.

Herman, E.B., 2007c, Alcohol as a source of tissue culture contamination. Agricell Report, vol. 49, nr. 1, p. 4.

Herman, E.B., 2007d, Promotion of micropropagation by bacteria and bacterial extracts. Agricell Report, vol. 49, nr. 2, p. 9-10.

Herman, E.B., 2007e, *Pseudomonas* inhibits pathogen action and improves *in vitro* growth. Agricell Report, vol. 48, nr. 1, p. 1.

Herman, E.B., 2008, Effect of agar brand on *in vitro* multiplication and hyperhydricity. Agricell Report, vol. 50, nr. 1, p. 9.

Herman, E.B., 2008a, Coculture with mycorriza-like fungi enhances of *Linum album* podophyllotoxin yield. Agricell Report, vol. 51, nr. 6, p. 44.

Herman, E.B., 2008b, Persistence of latent contaminants in micropropagated plant. Agricell Report, vol. 50, nr. 6, p. 41.

Herman, E.B., 2009, Coculture with microorganisms enhance secondary metabolite yields. Agricell Report, vol. 52, nr. 1, p.2.

Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., Duggar, B.M., 1946a, The influence of the composition of the medium on growth *in vitro* of excised tobacco sunflower tissue cultures. *Amer. J. Bot.* nr. 33, p. 591.

Hildebrandt, A.C., Riker, A.J. Duggar, B.M., 1946b, Influence of crown-gall bacterial products, crown-gall tissue extracts, and yeast extract on growth *in vitro* of excised tobacco and sunflower tissue. *Cancer Res.*, nr. 6, p.368.

Hildebrandt, A.C., 1958, Stimulation or inhibition of virus of infected and insect-gall tissues and single-cell clones. *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.*, nr. 44, p. 354.

Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., 1958, Viruses and single cell clones in plant tissue culture. Fed. Proc. 17, p. 986.

Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., Watertor, J.L., 1954, Growth and inhibition of tissue cultures on media with different concentrations of organic acids. *Phytopathol.*, nr. 44, p. 422-428.

Hildrum, K.I., Scanlan, R.A., Libbey, L.M., 1976, In: *Enviromental n-Nitroso Compounds Analysis and Formation*, vol. 14, (Ed. coord.) Walker, E.A., Bogovski, P., Gricinte, L., (Edt.) *International Agency for Research on Cancer* (IARC), p. 205-214.

Hirth, L., Lebeurier, G., 1962, Infection de cultures de tissus de tabac au moyen de l'acide ribonucléique extrait du virus de la mosaique du tabac. *C.R. Acad. Sci., Paris*, nr. 254, p. 492.

Hirth, L., Segrétain, G., 1956, Quelques aspects de la multiplication du virus de la mosaique du tabac en culture de tissus. *Ann. Inst. Pasteur, 91*, p. 523-536.

Holand, M.A., Polacco, J.C., 1994, PPFMs and other covert contaminants: Is there more to plant physiology than just plant? *Annu. Rev. Plant Physiol.*, nr. 45, p. 197-209.

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

Hooykaas, V.S., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A., 1984, Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. Nature, nr. 311, p. 763-764.

Hooykaas, P.J.J., Ooms, G., Schilperoort, R.A., 1982, Tumors induced by differend strains of *Agrobacterium tumefaciens*. In: *Molecular Biology of Plant Tumors*, (Ed. coord.) Kahl, G., Schell, J.S., (Edt.) New York Academic Press, p. 373-390.

Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A., 1984, *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology, nr. 19, p. 15-38.

Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eichholtz, R., Rogers, S.G., Fraley, R.T., 1985, A simple and general method for transferring genes into plants. Science, nr. 227, p. 1229-1231.

Horsch, R.B., King, J.A., 1983, A covert contaminant of cultured plant cells: elimination of a *Hyphomicrobium* sp. from cultures of *Datura innoxia* (Mill.). Plant Cell Tiss. Org. Cult., nr. 2, p. 21-28.

Horst, R.K., Cohen, D., 1980, Amantadine supplemented tissue culture medium: a method for obtaining chrysathemum free of chrysathemum stunt viroid. Acta Hortic., nr. 110, p. 315-319.

Hosokawa, M., Otake, A., Ohishi, K., Ueda, E., Hayashi, T., Yazawa, S., 2004a, Rescue of shoot apical meristems of chrysanthemum by culturing on root tips. Plant Cell Rep, nr. 22, p. 443-448.

Hosokawa, M., Otake, A., Ohsihi, K., Ueda, E., Hayashi, T., Yazawa, S., 2004b, Elimination of chrysanthemum stunt viroid from an infected chrysanthemun cultivar by shoot regeneration from a leaf primordium-free shoot apical meristem dome a attachet to a root tip. Plant Cell Rep., nr. 22, p. 859-863.

Hoston, H.H., Cutter, V.M., Jr. 1951, The isolation and culture of *Gymnosporangium juniperi-virgini [a] nae* Schw. upon artificial media. *Proc. Nat. Acad, Sci., Wash.*, nr. 37, p. 400-403.

Hyde, C., Phillips, G., 1996, Silver nitrate promotes shoot development and plant regeneration of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) via organogenesis. *In vitro* nr. 32, p. 72-80.

Installe, P., Cesar, G., Hofinger, M., Gaspar, Th., 1985, Evolution dans la composition en macroéléments des milieux de culture pour tissus végétaux. Meded Fac Landbouwwet Rijksuniv Gent 50/2a, p. 317-325.

Isaac, S., 1992, *Fungal-Plant Interaction*, (Edt.) Chapman & Hall, London, New York, Tokyo, Melbourne, Madras.

Ivanova, M., Novák, O., Strnad, M., Staden, J.V., 2006, Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured in vitro in relation to hyperhydicity, exogenous cytokinins and gelling agents. Plant Growth Regul, nr. 50, p. 219-230.

Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S., 1998, *Somaclonal Variations and induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Jain A., Kantia A., Kothari S.L., 2001, De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. Scientia Horticultu rae, vol. 4, nr. 87, p. 319-326.

Jao R.C., Fang W., 2004, Effects of frequency and duty ratio on the growth of potato plantlets in vitro using lght-emitting diodes, Hort Science, vol. 2, nr. 39, p. 375-379.

Jensen, C.O., 1910, Von echten Geschwülsten bei Pflanzen. Deuxième Conférence International pour l'Etude du Cancer. Rapport. Paris. K. Vet. Højsk Aarsskr., nr. 7, p.243.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Johansson, C., Bergman, B., 1992, Early events during the establishment of the Gunnera/Nostoc symbiosis. Planta, nr. 188, p. 403 413.

John, A., 1986, Vitrification in Sitka spruce cultures. In: *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications*, (Ed. coord.) Withers L., Alderson P.G., (Edt.) Butterworth, London, p. 167-174.

John, A., Pearson, D.J., 1985, Vitrification in Sitka spruce (*Picca sitchensis*) cultures, News Bull Br Plant Growth Regul. Group nr. 7, p. 35.

Jonard, R., Hugard, J., Macheix, J.J., Martinez, J., Mosella-Chancel, L., Poessel, J.L., Villemar, P., 1983, In vitro micrografting and its applications to fruit science. Sci. Hort., nr. 20, p. 147-159.

Jones, O.P., 1976, Effects of phoridzin and phloroglucinol on apple shoots. Nature, nr. 262, p. 393-393.

Jumpponen, A., Trappe, J.M., 1998, Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. New Phytol., nr. 140, p. 295-310.

Kadota, M., Imizu, K., Hirano, T., 2001, Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. Scientia Horticulturae, vol. 3, nr. 89, p. 207-215.

Kadota, M., Niimi, Y., 2003, Effect of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. Plant Cell Tiss. Organ Cult., vol. 3, nr. 72, p. 261-265.

Kadota, M., Niimi, Y., 2004, Improvement of micropropagation of Japanase yam using liquid and gelled medium culture. Scientia Horticulturae, vol. 4, nr. 102, p. 461-466.

Karamanoli, K., 2002, Secondary metabolites as allelochimicals in plant defence agains microorganism of the phyllosphere. In: *Allelopathy, from Molecules to Ecosystems*. (Ed. coord.) Regiosa, M., Pedrol, N. (Edt.) Dep. de Biol. Veget. e Ciencia do Solo, Universidade de Vigo, Spain, p. 277-288.

Kandler, O., 1951, Űber den Einfluss von Bodenbakterien und deren Filtraten auf das Wachstum in vitro kultivierter Wurzeln. *Arch. Mikrobiol.*, nr. 15, p.430.

Kassanis, B., 1950, Heat inactivation of leaf-roll virus in pottato tubers. Ann. Appl. Biol., nr. 37, p. 339-341.

Kassanis, B., 1957, The use of tissue cultures to produce virus-free clones from infected potato varieties. *Ann. Appl. Biol.*, nr. 45, p. 422-427.

Kassanis, B., 1965, Therapy of virus-infected plants. J. R. Agric. Soc. England, nr. 126, p. 105-114.

Kataeva, N.V., I.G. Alexandrova, R.G. Butenko, E.V. Dragavtceva, 1991, Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult., nr. 27, p. 149-154.

Katupitiya, S., New, P.B., Elmerich, C., Kennedy, I.R., 1995, Improved N_2 fixation in 2,4-D treated roots associated with *Azospirillum lipoferum:* studies of colonization using reporter genes. Soil Biol. Biochem., nr. 27, p. 447-452.

Kennedy, I.R., Tchan, Y.T., 1992, Biological nitrogen fixation in non leguminous crops: recent advances. Plant Soil, nr. 141, p. 93-118.

Kennedy, I.R., Zeman, A., Tchan, Y., New, P.B., Sriskandarajah, S., Nie, Y.F., 1990, Biological nitrogen fixation and prospects for yield increases in wheal. Trans. 14th Int. Contr. Soil Sci. III, p. 146-151.

Kerr, A., 1969, Transfer of virulence between strains of Agrobacterium. Nature, nr. 223, p. 1175-1176.

Kevers, C., Gaspar, T., 1985a, Solubile membrane and wall peroxidases, phenilalanine amonialyase, and lignin changes in relation with vitrification of carnation tissues cultured *in vitro*. J. Plant Physiol., nr. 118, p. 41-48.

Kevers, C., Gaspar, T., 1985b, Vitrification of carnation *in vitro*: changes in ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. Plant Cell Tissue Organ Culture, nr. 4, p. 215-223.

Kevers, C., Gaspar, Th., 1986, Vitrification of carnarion in vitro: changes in water content, extracellular space, air volume, and ion levels, Physiol. Veg, nr. 24, p. 647-653.

Kevers, C., Bisbis, B., Le Dily, F., Billard, J.P., Huault, C., Gaspar, T., 1995, Darkness improves growth and delays necrosis in a non chlorophyllous habituated sugarbeet callus. Biochemical chages. In Vitro Cell Dev Biol, 31., p. 122-126.

Kevers, C., Bisbis, B., Franck, T., Le Dily, F., Huault, C., Billard, J.P., Foidard, J.M., Gaspar, Th., 1997, On the possible causes of polyamine accumulation in *in vitro* plant tissues under neoplasic progression. In: *Travelling Shot on Plant Development*, Greppin, H., Penel, C., Simon, P., (eds), Univ. of Geneva, Switzerland, p. 63-71.

Kevers, C., Bisbis, B., Faivre-Rampant, O., Gaspar, T., 1999, Putrescine metabolism in a fully habituated nonorganogenic sugar beet calus and its relationship with growth., J. Plant Physiol., vol. 154, p. 503-508.

Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gilles, M.F., Gaspar, Th., 1984, Physiological and biochemical events leading to vitrifications of plants cultured *in vitro*. Physiol Plant 51, p.281-286.

Kevers, C., Coumans, M., Coumans-Gilles, M.F., Gaspar, T.H., 1984a, Physiological and biochemical events leading to vitrification in plants cultured in vitro, Physiol Plant nr. 61, p. 69-74.

Kevers, C., Coumans, M., De Greef, W., Jacobs, M., Gaspar, T., 1981a, Organogenesis in habituated sugarbeet callus: auxin content and protectors, peroxidase pattern and inhibitors. Z. Pflanzenphysiol., nr. 101: p. 79-87.

Kevers, C., Coumans, M., De Greef, W., Hofinger, M., Gaspar, T., 1981b, Habituation in sugarbeet callus: auxin content, auxin protectors, peroxidase pattern and inhibitors. Physiol. Plant. 51: p. 281-286.

Kevers, C., Gaspar, T., Crèvecoeur, M., 1985, Nature et teneur des polyamines de cals normaux et habitués de betterave sucrière. Effet des régulateur de croissance du milieu de culture. Botan. Helvetica, nr. 95, p. 117-120.

Kevers, C., Gaspar, Th., Dommes, J., 2002, The beneficial role of different auxins and polyamines at successive stages of somatic embryo formation and development of *Panax ginseng in vitro*. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70. Kluwer Academic Publishers, p. 181-188.

Kevers, C., Goldberg, R., Chu-Ba, J., Gaspar, Th., 1988, Composition of the wall of stem and leaves of vitrifying carnation, Biol Plant nr. 30, p. 219-223.

Kevers, C., Greimers, R., Franck, T., Bisbis, B., Dommes J., Gaspar, T., 1999, Flow cytometry estimation of nuclear size and ploidy level of habituated calli of sugar beet. Biolgia Plantarum, t. 42, nr.3, p. 321-332.

Kevers, C., Prat, R., Gaspar, Th., 1987, Vitrification of carnation in vitro: changes in cell wall mechanical properties, cellulose and lignin content, Plant Growth Regul nr. 5, p. 59-66.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

Kevers, C., Hagège, D., Penel, C., Greppin, H., Gaspar, Th., 1992, Intra- and extracellular ascorbate peroxidase and ascorbate oxidase activities in normal and fully habituated sugarbeet calli. Arch. Intern. Physiol. Biochim. Biophys., nr. 100, B15.

Kieffer, M., Fuller, M.P., Jellings, A.J., 1995, Rapid mass production of cauliflower propagules from fractionated and graded curd, Plant Science nr. 107 (2), p. 229-235.

Kirlian, S.D., Kirlian, V.Kh., 1961, J. Of Scientific and Applied Photography, nr.6, p. 397-403.

Kirlian, S.D., Kirlian, V., 1973, Digest of I Intern. Congr. of Psychotronic, vol. II, Praga.

Kombrink, K., Schmelzer, E., 2001, The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance, Eur. J. Plant Pathol, nr. 107, p. 69-78.

Komali A.S., Zheng Z., Shetty K., 1999, A mathematical model for the growth kinetics and synthesis of phenolics in oregano (*Origanum vulgare*) shoot cultures inoculated with *Pseudomonas* species, Process Biochemistry, vol. 3-4, nr. 35 (3-4), p. 227-235.

Kőves, E., Szabó, M., 1987, Ethylene production in habituated and auxin requiring tobacco callus cultures. Does ethylene play a role in the habituation? – Physiol. Plant., nr. 69, p. 351-355.

Kozai, T., 1991, Acclimatization of micropropagated plants, Eds. Y.P.S. Bajaj, Springer-Verlag, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 17, High-Tech and Micropropaga-tion Vol. I, Berlin Heindelberg New York, p. 127-141.

Krsnik-Rasol, M., Jelaska, S., 1991, Peroxidases in relation to differentiation a tumor transformation in plants. In: Lobarzewski, J., Greppin, H., Périel, C., Gaspar, T., eds, Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases, Univ. Geneva, Switzerland, p. 373-382.

Krueger, S., Robacker, C., Simonton, W., 1991, Culture of *Amelanchier* x *grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. Plant Cell Tiss. Organ Cult., nr. 27, p. 219-226

Kutsky, R., Rawlins, T.E., 1950, Inhibition of virus multiplication by napthtalene acetic acid in tobacco tissue cultures as revealed by a spectrophotometric method. *Jour. Bacteriol.*, nr. 60, p. 763-766.

Kostoff, D., 1930, Tumors and other malformations on certai *Nicotiana* hybrids. *Zbl. Bakt.* Abt. 2, p. 244-260.

Kunkel, L.O., 1936, Heat treatment for the cure of yellows and other virus diseases of peach. Phytopathology, nr. 26, p. 809-830.

Lai, C.C., Lin, H.M., Nalawade, S.M., Fang, W., Tsay, H.S., 2004, Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels, Plant Physiology, vol. 7, nr., p. 847-853.

Lai, C.C., Lin, H.M., Nalawade, S.M., Fang, W., Tsay, H.S., 2005, Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels, Plant Physiology, vol. 3, nr. 162, p. 355-361.

Lance, C., 1956, Recherches préliminaires sur les systèmes oxydasiques des tumeurs primaires obtenues par inoculation d'*Agrobacterium tumefaciens* dans des fragments de tubercules de *Topinambour* cultivés *in vitro*. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, nr. 2, p. 76-77.

Larsen, E.C., 1974, Heat inactivation of viruses in apple cl MM 109 by use of daily temperature cycles. Tidsskr. Planteavl, nr. 78, p. 422-428.

Lavee, S., Messer, G., 1969, The effect of growth-regulation substances and light on plive callus growth in vitro, J Exp Bot, nr. 20, p. 604-614.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Le Dily, F., Billard, J.P., Boucaud, J., 1991, Polyamine levels in realtion to growth and NaCl concentration in normal and habituated sugarbeet callus cultures. Plant Cell Environ, nr. 14, p. 327-332.

Le Dily, F., Billard, J.P., Gaspar, T., Huault, C., 1993a, Disturbed nitrogen metabolism associated with the hyperhydric status of fully habituated callus of sugarbeet. Physiol. Plant., nr. 88, p. 129-134.

Le Dily, F., Billard, J.P., Huault, C., Kevers, C., Gaspar, T., 1993b, Fully habituated sugarbeet callus: Under permanent stress? In vitro Cell Dev Biol, nr. 29P, p. 149-154.

Le Dily, Huault, C., Gaspar, Th., Billard, J.P., 1993, Does altered nitrogen metabolism and H_2O_2 accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* L.). Plant Cell Tiss. Organ Cult., vol. 35, p. 69-74.

Le Dily, F., Kevers, C., Huault, C., Billard, J.P., 1998, Le cal habitue de betterave sucriere: deviations metaboliques et cancerisation. Bull. Soc. Royale des Sc. de Liège, vol. 67, nr. 3-4, p. 165-176.

Lee, Y.H., Kim, H.S., Kim, J.Y., Jung, M., Park, Y.S., Lee, J.S., Choi, S.H., Her, N.H., Lee, J.H., Hyung, N.I., Lee, C.H., Yang, S.G., Harn, C.H., 2004, A new selection method for pepper transformation: callus-mediated shoot formation. *Plant Cell Reports*, nr. 23, p. 50-58.

Leifert, C., Cassells, A.C., 2001, Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In Vitro Cell. Dev. Biol – Plant., (Soc. for In Vitro Biology), nr. 37, p. 133-138.

Leifert, C., Ritchie, J.Y., Waites, W.M., 1991, Contaminat of plant-tissue and cell cultures. World J. Microbiol. and Biotech., nr. 7, p. 452-469.

Leifert, C., Waites, W.M., 1992, Bacterial growth in plant tissue culture media. J. Appl. Bacteriol., nr. 72, p. 460-466.

Leonhardt, W., Kandeler, R., 1987, Ethylene accumulation in culture vessels, a reason for vitrification?, Acta Hortic nr. 212, p. 223-229.

Leshem, B., 1983a, Growth of carnation meristems in vitro: anatomical structure of abnormal plantlets and the effect of agar concentration in the medium on their formation, Ann. Bot. nr. 52, p. 413-415.

Leshem, B., 1983b, The carnation succulent plantlet, a stable teratological growth. Ann. Bot., nr. 52, p. 873-876.

Leshem, B., 1986, Carnation plantlets from vitrified plants as a source of somaclonal variation. HortScience, nr. 21, p. 320-321.

Leshem, B., Sachs, T., 1985, Vitrified *Dianthus* teratoma in vitro due to growth factor imbalance, Ann Bot, nr. 56, p. 613-617.

Leshem, B., Shaley, D.P., Izhar, S., 1988, Cytokinin as an inducer of vitrification in melon, Ann Bot, nr. 61, p. 255-260.

Letouzé, R., Daguin, F., 1983, Manifestation spontanée et aléatoire d'une croissance anormale en culture *in vitro*. Recherche de marqueurs métaboliques. Rev. Can. Biol. Exp., nr. 42, p. 23-28.

Lewis, K.H., Mc Coy, E., 1933, Root module formation on the garden bean, studied by a tehnique of tissue culture. *Bot. Gaz.*, nr. 112, p. 281-329.

Lewis, I.F., Walton, L., 1958, Gall-formation on *Hamamelis virginiana* resulting from material injected by the aphid *Hormaphis hamamelidis*. *Trans. Amer. micr. Soc.* nr. 77, p. 146.

Li-Hua Zhu, Xuc-Yuan Li, Welander Margareta, 2005, Optimisation of growing conditions for the apple roostock M26 grown in RITA containers using temporary immersion principle. Plant Cell, Tiss. Organ Cult., nr. 81, p. 313-318.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Lim, H.T., Lee, K., Yoo, Y.S., Yang, D.C., 1999, Plant regeneration of hot pepper and expression of mouse adenosine-deaminase gene via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Hortscience*, nr. 31, p. 572.

Lima-Nishimura, N., Quoirin, M., Naddaf, Y.G., Wilhem, H.M., Ribas, L.L., Sierakowski, M.R., 2002, A xyloglucan from seeds of the native Brazilian species Hymenaea courbaril for micropropagation of Marubakaido and Jonagored apples. Plant Cell Rep. Jan, vol. 5, nr. 21, p. 402-407.

Limasset, P., Cornuet, P., 1949, Recherche du virus de la mosaique du tabac (*Marmor Tabaci* Holmes) dans des méristèmes de plantes infectées. C.R. Acad. Sci. Paris, nr. 228, p. 1971-1972.

Linderman R.G., 1994, Role of VAM fungi în biocontrol. In: *Mycorrhizae and Plant Health* (Ed.coord.) Pfleger, F.L., Linderman, R.G., (Edt.), APS Press, St. Paul, p. 1-26.

Liners, F., Gaspar, T., Van Custem, P., 1994, Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugarbeet calli:consequences for intracellular adhesion. Planta, nr. 192, p. 545-556.

Limasset, P., Gautheret, R.J., 1950, Sur le caractère tumoral des tissus de *Tabac* ayant subi le phénomène d'accoutumance aux hétéro-auxines. C. R. Ac. Sc., nr. 230, p. 2043-2045.

Lioret, C., 1957, Les acides aminés libres des tissus de crown gall cultivés *in vitro*. Mise en évidence d'un acide aminé particulier à ces tissus. C.R. Acad. Sci., nr. 244, p. 2171-2174.

Liu, S.T., Kado, C.I., 1979, Indolacetic acid production: Function of *Agrobacterium tumefaciens* C-58. Biochem. Biophys. Res. Comm., nr. 90, p. 171-178.

Liu, S.T., Perry, K.L., Schardl, C.L., Kado, C.I., 1982, *Agrobacterium* indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences (U.S.A.), nr. 79, p. 2812-2816.

Lovato P.E., Schuepp H., Trouvelot A., Gianinazzi S., 1995, Application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) în orchard and ornamental plants. In: *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology* (Ed.coord) Varma, A., Hock, B., (Edt.), Springer, Heidelberg, p. 521-559.

Lovato, P.E., Gianinazzi-Pearson, V., Trouvelot, A., Gianinazzi, S., 1996, The state of mycorrhizas and micropropagation. Adv. Hort. Sci., nr. 10, p. 46-52.

MacRae, S., Van Staden, J., 1993, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation to improve rooting ability of eucalypts. Tree Physiology, nr. 12, p. 411-418.

Maene, L., Debergh, P., 1987, Optimalisation of the transfer of tissue cultured shoots *in vivo* conditions. Acta hortic., nr. 212, p. 335-348.

Manoharan, M., Vidya, C.S.S., Sita, G.L., 1998, *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in hot chili (*Capsicum annuum* L. var. Pusa Jwala). *Plant Science*, nr. 131, p. 77-83.

Marga E., 1994, Agar Fragments Prevent Hyperhydricity in Liquid Medium, Agricell Report, vol. 19, nr. 23, p. 29.

Marino, G., Magnanini, E., Battistini, S., Righetti, B., 1991, Effect of hormones and main carbon energy sources on *in vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.)cvs. "San Castrese" and "Portici". ActaHort., 293, p. 355-362.

Martin, S.M., 1980, Mass culture systems for plant cell suspensions. In:Plant *Tissue Culture as a Source of Biochemicals*, (Ed) Staba, E.J., (Edit.), CRC Press Inc. Boca Raton Florida, p. 149-166.

BCU CLUJ-NAPOCA UNIVERSITY LIBRARY

Martins, A., Barroso, J., Pais, M.S., 1996, Effect of ectomycorrhizal fungi on survival and growth of micropropagated plants and seedlings of *Castanea sativa* mill. Mycorrhiza, nr. 6, p. 265-270.

Maxim, A., Isac, M., Zagrai, I., Papp, I., 2002, *Virusologie pomicolă*, Ed. Ceres. Bucureşti.

Maximilian, C., Brezeanu, A., Carasan, M.E., 1999, Histochemical and biochemical studies regarding experimental colonisation with vesicular-arbuscular mycorrhiza. Proceedings of the institute of Biology, II, Bucureşti, p. 315-324.

Maximilian, C., Carasan, M.E., Brezeanu, A., 1998, The electrophoretic spectrum of total proteins and isoenzymes isolated from radicular tissue colonised with mycorrizal fungus. AHB Buc., p. 109-114.

Maximilian, C., Carasan, M.E., Brezeanu, A., Roşu, A., 2000, Comparative analisys for detection of the ability of mycorrhizas establishment using different species of *Glomus*. In: *Current Problems in Cellular and Molecular Biology* (Edt.coord. Crăciun, C., Ardelean, A.). Lucrările primului Congres Internaţional al Soc. Nat. de Biol. Celulară, p. 441-447.

Maximilian, C., Carasan, M.E., Brezeanu, A., 2002, Biotehnologiile micorizale, modalităţi de îmbunătăţire a performanţelor biologice ale plantelor. În: *Lucr. celui de al X-lea Simp. Naţ. de Cult. de Ţes. şi Cel. Veget. Manifestare jubiliară „25 de ani de culturi de ţesuturi vegetale în România"* 10-11 noiembrie 2000, Cluj-Napoca. (Ed.coord.) Cachiţă, C.D., Rakosy-Tican, L., Ardelean, A., (Edt.), Risoprint, Cluj-Napoca, p. 85-102.

Maximilian, C., Carasan, M.E., Brezeanu, A., Roşu A., 2004, Interacţia celulă vegetală-celule microbiene – semnificaţii teoretice şi apicative. În: *Lucr. celui de al XII-lea Simp. Naţ. de Cult. de Ţes. şi Cel. Veget.* 5 iunie 2003, Jibou., intitulat: *Fiziologia celulei vegetale în regim de vitrocultură*. (Ed.coord), Cachiţă, C.D., Ardelean, A., Fati, V., (Edt). Daya, Satu Mare, p. 67-97.

Mayor, M.L., Nesteres, G., Zorzoli, R., Picardi, L.A., 2003, Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. Plant Cell Tiss. Organ Cult., vol. 1, nr. 72, p. 99-103.

McAfee, B.J., White, E.E., Pelcher, L.E., Lapp, M.S., 1993, Root induction in pine (*Pinus*) Larch (Larix) spp. using *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Cell, Tiss. Organ Cult.. nr. 34, p. 53-62.

McCown, B.H., 1988, Adventitious rooting of tissue cultured plants. Cap.21. În: *Adventitious Root Formation in Cuttings. Advance in Plant Sciences Series*, vol. 2, (Edt.) Davis, T.D., Haissig, B.E., Sankhla, N., (Edt), Dioscorides Press, Portland, Oregon, p. 289-302.

Meins, F.J., 1982, Habituation of cultured plant cell. In: *Molecular Biology of Plant Tumors*. (Ed.coord.) Kahl, G., and Schell, J.S. (Edt), Academic Press New York, Inc, p. 3-31.

Meins, F., 1987, Hormones and the molecular basis of determination in plants. In: *Advances in the Chemical Manipulation of Plant Tissue Cultures*. (Ed.coord) Jackson, M.B., Mantell, S.H., Blake, J., (Edt). British Plant Growth Regulator Group, Monograph, nr. 16, p. 19-28.

Meins, F., 1989, Habituation: heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. Annu. Rev. Genet., nr. 23, p. 303-408.

Melchers, L.S., Hooykaas, P.J.J. 1987, Virulence of Agrobacterium. Plant Mol. and Cell Biology, vol. 4, p. 167-220.

Mellor, F.C., Fitzpatrick, R.E., 1961, Strawberry viruses. Can. Plant Dis. Surv., nr. 41, p. 218-255.

Mellor, F.,C., Stace-Smith, R., 1977, Virus-free potatoes by tissue culture. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*. (Ed.coord.) Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., (Edt). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, p. 616-635.

Mérillon, J.M., Filali, M., Dupéron, P., Montagu, M., Chénieux, J.C., Rideau, M., 1995, Plant Physiol. Biochem. nr. 33, p. 443-451.

Miedema, P., 1982, A tissue culture technique for vegetative propagation and low tem perature preservation of *Beta vulgaris*, Euphytica, nr. 31, p. 635-643.

Miedema, P., 1984, The effects of growth regulators onvitrification in shoot cultures of *Beta vulgaris,* Acta Bot Neerl, nr. 33, p. 375-379.

Miguens, F.C., Louro, R.P., Machado, R.D., 1993, A scanning electron microscope study of normal and vitrified leaves from *Datura insignid* plantlets cultured *in vitro*. Plant Cell Tiss. Organ Cult., nr. 32, p.109-113.

Mihaljevic, S., Stipkovic, S., Jelaska, S., 1996, Increase of root induction in *Pinus nigra* explants using agrobacteria. Plant Cell Reports, nr. 15, p. 610-614.

Mihaljevic, S., Katavic, V., Jelaska, S., 1999, Root formation in micropropagated shoot of *Sequoia sempervirens* using *Agrobacterium*. Plant Sci, 141, p. 73-80.

Milne, R.G., Luisoni, E., 1977, *Rapid immune electron microscopy of virus preparations. Method in Virology*, VI. (Edt.) Acad. Press. London.

Mills, D., Tal, M., 2004, The Effect of Ventilation on *in vitro* Response of Seedlinngs of the Cultivated Tomato and its Wild Salt-tolerant Relative *Lycopersicon pennellii* to Salt Stress. Plant Cell, Tiss. Organ Cult., Springer, vol. 78, nr.3, p. 209-216.

Mitică, O., Roşu, A., Maximilian, C., 2005, Studii privind utilizarea simbiozei de tip micoriză în procesul de aclimatizare a vitroplantulelor de dud (*Morus alba* L.). În: *Lucr. celui de al XIII-lea Simp. Naț. de Cult. de Țes. și Cel. Vege.*, 10 iunie 2004, Sighișoara, intitulat: *Vitroculturile la cormofite, modele experimentale în cercetările de biologie*, (Ed.coord.) Cachiță , C.D., Ardelean, A., (Edt.), Bion – Satu Mare, p. 68-79.

Mőllers, C., Sarkar, S., 1989, Regeneration of healthy plants from *Catharanthus roseus* infected with mycoplasma-like organisms through callus-culture. *Plant Science*, nr. 60, p. 83-89.

Monette, P.L., 1983, Influence of size of culture vessel on *in vitro* proliferation of grape in a liquid medium. Plant Cell Tiss. Organ Cult., nr. 2, p. 327-332.

Monteuuis, O., 1986, *In vitro* micrograffing of *Sequoiqdendron giganteum meristems.* C.R. Acad. Sc. Paris, nr. 302, Sére III nr. 6, p. 223-225.

Monteuuis, O., 1987, Annales AFOCEL, p. 39-61.

Monteuuis, O., Dumas, E., 1990, Microgreffage de méristèmes de conifères âgés: fondements et présentation. In: *Cinquantenaire de la culture in vitro*, Versailles (Franța). (Ed.), Doré, C., INRA, Paris, p. 299-301.

Morel, G., 1944, Le développment du mildiou sur des tissus de vigne cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sci., Paris*, nr. 218, p. 50.

Morel, G., 1948, Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Thèse, Paris, 112 p. p. 123-234.

Morel, G., 1956, Métabolisme de l'arginine par les tissus de crown-gall de Topinambour. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég.*, nr. 2, p. 75.

Morel, G., Martin, C., 1952, Guérison de Dahlias atteints d'une maladie à virus. C.R. Ac. Sc., nr. 235, p. 1324- 1325.

Morel, G., Martin, C., 1955, Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *C.R. Ac. Agric.*, nr. 41, p. 472-475.

Mosella L.C., Riedel, M., Jonard, R., Signoret, P.A., 1979, Développement *in vitro* d'apex de Pêcher (*Prunus persica* Batsch), possibilités d'applications. C.R. Acad. Sci., nr. 289, p. 1335-1338.

Mosella L.C., Signoret, P.A., Jonard, R., 1980, Sur la mise au point de techniques de microgreffage d'apex en vue de l'elimination de deux types de particules virales chez le pêcher (*Prunus persica* Batsch). C.R. Acad. Sci., nr. 290, p. 287-290.

Mumford, R.A., Walsh, K., Boonham, N., 2000, A comparison of molecular method for the routine detection of viroids. Bulletin OEPP, vol. 30, nr. 4, p. 433-435.

Murashige, T., 1974, Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant. Physiol. nr. 25, p. 135-166.

Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., nr. 15, p. 327-332.

Navalet, J.C., 1982, Problemes lies a la production de porte-greffe d'arbres fruitiers par multiplication in vitro. Fruits nr. 37, p. 331-336.

Navarro, L., Roistacher, C.N., Murashige, T., 1975, Improvement of shoot tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. J. Am. Soc. Hort. Sci., nr. 100, p. 471-479.

Nedelcu, I., 2002, „Cancerul, condamnat la moarte", Sănătatea, nr. 533, p. 13.

Nickell, L.G., 1949, The effect of certain plant hormones on the growth and respiration of virus tumors of *Rumex*. *Amer. Jour. Biol.*, nr. 38, p. 826-827.

Nickell, L.G., 1952, Vitamin B_1 requirement of *Rumex* virus tumor tissue. *Bull. Torrey Bot. Club*, nr. 79, p. 427-430.

Nickell, L.G., 1955, Nutrition of pathological tissues caused by plant viruses. *Ann. Biol.*, nr. 31, p. 107-121.

Nickell, L.G., Brakke, M.K., 1954, Secretion of α-amylase by *Rumex* virus tumors in vitro. Biological studies. *Amer. Jour. Bot.*, nr. 41, p. 390-304.

Nickell, L.G., Greenfield, P., Burkholder, P.R., 1950, Atypical growth of plants. III. Growth responses of virus tumors of Rumex to certain nucleic acid components and related compounds. Bot. Gaz., nr. 112, p. 42-52.

Nie, Y.F., 1983, Studies on induced nodulation by 2,4-D on non-legumes. Nature J. (Chinese), nr. 5, p. 326-336.

Niemi, K., Häggman, H., 2002a, Pisolithus tinctorius promotes germination and forms mycorrhizal structurea in Scots pine somatic embryos in vitro. Mycorrhiza, Oct; vol. 12, nr. 5, p. 263-267.

Niemi, K., Häggman, H., Sarjala, T., 2002b, Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine in vitro. Tree Physiology, nr. 22, p. 373-381.

Niemi, K., Salonen, M., Ernstsen, A., Heinonen-Tanski, H., Häggman, 2000, Application of ectomycorrhizal fungi in rooting of Scots pine fascicular shoots. Can. J. For. Res., nr. 30, p. 1221-1230.

Niemi, K., Vuorinen, T., Ernstsen, A., Häggman, H., 2002c, Ectomycorrhizal fungi and exogenous auxins influence root and mycorrhiza formation of Scots pine hypocotyl cuttings *in vitro*. Tree Physiology, nr. 22, p. 1231-1239.

Nobécourt, P., 1927, Contribution à l'etude de l'immunité chez les végétaux. *Thèse, Lyon*, 174 p.

Nowak, J., 1998, Benefits of *in vitro* biotization of plant tissue cultures with microbial inoculants. In Vitro Cell Dev. Biol. Plant., nr. 34, p. 122-130.

Nowak, J., Asiedu, S.K., Lazarovits, G., Pillay V., Stewart, A., Smith, C., Liu, Z., 1995, Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In: *Proceedings of the International Symposium of Ecophysiology and Photosynthetic in vitro Cultures.* Provence, France, p. 173-180.

Ochatt, S.J., Muneaux, E., Machado, C., Jacas, L., Pontécaille. C., 2002, The hyperhydricity ofin vitroregenerants of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is linked with an abnormal DNA content. Plant Physiology, vol. 9, nr. 159, p. 1021-1028.

O'Gara, F., 1996, The biotechnology and ecology of rhizosphere microorganisms. In: *Novel biotechnological approaches to plant production: from sterile root to mycorrhizospher.* Joint COST meeting 8,21, Pisa, Italy, p. 11.

Olmos, E., Hellin, E., 1998, Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants, Scientia Horticulturae, vol. 1-2, nr. 75, p. 91-101.

Olmos, E., Piqueras, A., Martínez-Solano, J.R., Hellín, E., 1997, The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leaves of regenerated carnation plants. Plant Science, vol. 1, nr. 130, p. 97-105.

Orlikowska, T., 1987, Vitrification problem in the in vitro culture of fruit tree rootstocks. Acta Hortic, nr. 212, p. 239-244.

Orlikowska, T.K., Dyer, W.E., 1993, In vitro regeneration and multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Plant Science, vol. 1-2, nr. 93, p. 151-157.

Pack, K.Y., Hahn, E.J., 2000, Cytokinins, auxins and activated charcoal affect organogenesis and anatomical characteristics of shoot top cultures of lisianthus {*Eustomia grandiflorum* (Raf.) Shinn}, In vitro Cell Dev. Biol. Plant, nr. 36, p. 128-132.

Pamfil, D., 1999, *Microbiologie*, Ed. Genesis, Cluj-Napoca.

Pâques, M., Boxus, P.H., 1986, Utilization of a hydrolysed agar extract to prevent vitrification of the apple M26 rootstock, cultivated in vitro, Arch Int Physiol Biochim, nr. 94, p. 33.

Pâques, M., Boxus, P.H., 1987a, Vitrification: review of literature. Acta. Hort., nr. 212, p. 155-166.

Pâques, M., Boxus, P.H., 1987b, Vitrification: a phenomenon related to tissue water content? Acta. Hort., nr. 212, p. 245-252.

Pâques, M., Bercetche, L., Dumas, E., 1992, Liquid media to improve and reduce the cost of in vitro conifer propagation. Acta Hort., nr. 319, p. 95-100.

Park, S.W., Jeon, J.H., Kim, H.S., Park, Y.M., Aswath, C., Joung, H., 2004, Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots in vitro, Scientia Horticulturae, vol. 2, nr. 99, p. 199-205.

Pârvu, M., 1996, *Fitopatologie*, Presa Universitară Clujeană, Ed. Sincron, Cluj-Napoca.

Pârvu, M., 2003, *Botanică sistematică*, vol. I. Casa de Ed. Gloria, Cluj-Napoca.

Pasqualetto, P.L., Zimmerman,R.H., Fordham, I., 1986, The influence of gelling agent and growth regulator concentrations on apple cultivars *in vitro*, J. Am. Soc. Hort.Sci, 111, p. 976-980.

Pence, V.L., Novick, N.J., Ozias-Akins, P., Vasil, I.K., 1982, Induction of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* by conditioned medium from cell suspension cultures of *Pennisetum americanum* (Pearl Millet) and *Panicum maximum* (Guinea Grass). Z. Pflanzenphysiol., nr. 106, p.139-147.

Pérez-Tornero, O., Egea, J., Olmos, E., Bugos, L., 2001, Control of hyperhidricity in micropropagated apricot cultivars. In vitro Cellular and Development Biology-Plant., vol. 37. nr. 2, p 250-254.

BCU CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

Perry, P.L., Ueno, K., Shetty, K., 1999, Reversion to hyperhydration by addition of antibiotics to remove Pseudomonas in unhyperhydrated oregano tissue cultures. Process Biochemistry, vol. 6-7, nr. 34, p. 717-723.

Persinger, S., Town, C., 1991, Isolation and characterization of hormone-autonomous tumors of *Arabidopsis thaliana*. J. Exp. Bot. nr. 42, p. 1363-1370.

Peterson, R.L., Petereson, P.L., 1986, Ontogeny and anatomy of lateral roots. In: *New Root Formation in Plants and Cuttings*. (Ed.) Jackson, M.B. (Edt), Martinus Nijhoff Publications.

Petruş, C.M., 2008, Cercetări privind reacţia plantulelor hiperhidrice din vitrocultură la apa Pi şi la apa sărăcită în deuteriu. Teză de doctorat (Univ. din Oradea, cond. şt. Cachiţă, C.D.).

Petruş, C.M., Cachiţă, C.D., 2008a, Foliar and radicular sprinkling of *Tradescantia* cuttings, with different types of water, and their effect to organogenesis and the epidermal formations of foliar limbs. In: Anal. Univ. Oradea, Fasc. Biologie, vol. V, p.73-78.

Petruş-Vancea, A., 2007, Cercetări privind procesele morfofiziologice şi biochimice care au loc în decursul aclimatizării plantulelor generate „in vitro", la viaţa în mediul septic. Teză de doctorat (Univ. din Oradea, cond. şt. Cachiţă, C.D.).

Petruş, C.M., Cachiţă, C.D., Petruş-Vancea, A., 2004, Micropropagarea la *Cymbidium* şi *Petunia* pe medii de cultură preparate cu apă sărăcită în deuteriu. În: *Lucr. celui de al XII – lea Simp. Naţ. de Cult. de Ţes. şi Cel. Veget.*, Jibou 2003, intitulat: *Fiziopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură*. (Ed.coord. Cachiţă, C.D., Ardelean, A., Fati, V.,) Ed. Daya, Satu Mare, p. 185-192.

Petruş, C.M., Cachiţă, C.D., Petruş-Vancea, A., 2008c, Cercetări privind anihilarea fenomenelor de hiperhidrie la vitroplantulele de *Petunia*. În: *Lucrările celui de al XV-lea Simp. Naţ. de Cult. de Ţes. şi Cel. Veget.*, Bucureşti 2007, intitulat: Micropropagarea speciilor vegetale, (Ed. coord.) Cachiţă, C.D., Brezeanu, A., (Edt.) Risoprint Cluj-Napoca, p. 201-215.

Petruş, C.M, Petruş-Vancea, A., 2004a, Înrădăcinarea la butaşii de *Tradescantia* L., în condiţiile udării acestora cu apă Pi, Anal. Univ. Oradea, Fasc. Biologie, vol. XI., p. 187–189.

Petruş, C.M, Petruş-Vancea, A., Cachiţă, C.D., 2004b, Micropropagarea la *Cymbidium* şi *Petunia* pe medii de cultură preparate cu apă sărăcită în deuteriu. In: Lucrările celui de al XII -lea Simp. Naţ. de Cult. de Ţes. şi Cel.Veget., Jibou 2003, intitulat: „*Fiziopatologia celulei vegetale în regim de vitrocultură*", (Ed.coord.) Cachiţă, C.D, Ardelean, A., Fati, V., (Edt.), Daya, Satu Mare, p. 187–192,.

Petruş, C.M., Petruş-Vancea, A., Zahan, A., 2004c, Efectul apei Pi asupra germinaţiei la grâu, porumb şi ridichi. Anal. Univ. Oradea, Fasc. Biologie, vol. XI, p. 183-186.

Petruş-Vancea, A., Cachiţă, C.D., 2008b, Regards on *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium* Ramat var. *Lamet)*, leafs epidermis which were sprinkle, during "ex vitro" acclimatization period, with Pi water and deuterium depleted water, Studia Universitis „Vasile Goldiş" Arad Ser. Şt. Vieţii (Life Sc.Ser.), vol. 18, p. 81-86.

Petruş-Vancea, A., Cachiţă, C.D., Blidar, C.F., Ştefănescu, I., 2003, The Effect of Dedeuterised Water in Acclimatization of *Chrysanthemum* Vitroplantlets to Septic Medium. In: Papers of the 5th International Symposium Young People and Multidisciplinary Research, Editura Sudura, Timişoara, p. 335-340.

BCU CENTRU DE RESURSE

Phan, C.T., Hegedus, P., 1986, Posible metabolic basis for the development anomaly observed *in vitro* culture, called „vitreous plants". Plant Cell Tiss. Organ Cult. nr. 6, p. 83-94.

Phan, C.T., Letouzé, R., 1983, A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents and of hydroxycinnamate: CoA ligase activity of normal and vitreous plants (*Prunus avium* L.) obtained *in vitro*. Plant Sci Lett, nr. 31, p. 323-327.

Phillips, D.J., Matthews, G.J., 1964, Growth and development of carnation shoot tips in vitro. Botanical Gazzett, nr. 125, pp. 7-12.

Picoli, E.A., Otoni, W.C., Figueira, M.L., Carolino, S.M., Almeida, R.S., Silva, E.A., Carvalho, C.R., Fontes, E.P., 2001, Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of 2iP (Binding Protein). Plant Science, vol. 5, nr. 160, p. 857-868.

Pierik, R.L.M., 1989, *In vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhorff, Dordrecht.

Pierik, R.L.M., 1990, Rejuvenation and micropropagation. Newslett. Int. Ass. Plant Tiss. Cult., nr. 62, p. 11-21.

Pierik, R.L.M., 1991, Commercial micropropagation in Western Europe and Israel. In: *Micropropagation of horticultural crops*. (Ed.coord.) Debergh, P.C., Zimmerman R.H., (Edt), Kluwer Academic Publishers. Dordrecht (The Netherlands) p. 157-165.

Pillay, V.K., Nowak, J., 1997, Can. J. Microbiol. 43, p. 354-361 (din Agricell Rep., 1977/iunie, p. 42.

Piqueras, A., Cortina, M., Serna, D.M., Casas, J.L., 2002, Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. Plant Science, vol. 5, nr. 162, p. 671-678.

Pop, I., 1989, *Virusurile plantelor horticole și combaterea lor*, Ceres, București.

Porciani, S., Becciolini, A., Lanini, A., Balzi, M., Boanini, P., Mauri, P., Maugeri, A., 1993, Polyamines and proliferative activity in tumors tissues. Cell Prolif, nr. 26, p. 490.

Posnette, A.F., Cropley, R., 1959 – Heat treatment for the inactivation of strawberry viruses. J. Hort. Sci., nr. 33, p. 282-288.

Preininger, É., Korányi, P., Gyurján. I., 1997a, Creation of artificial symbiosis between *Azotobacter* and higher plants. In: *Eukaryotism and symbiosis - endocytobiology VI.* (Ed.coord.) Schenk, H.F.A., Herrman, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E., Schwemler, W. (Edt.) Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, p. 457-466.

Preininger, É., Zatykó, J., Szucs, P., Korányi, P., Gyurján. I., 1997b, *In vitro* establishment of nitrogen-fixing strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) via artificial symbiosis with *Azomonas insignis*. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. nr. 33, p. 190-194.

Preininger, É., Bóka, K., Zatykó, J., Korányi, P., Gyurján. I., 1999, Methods for introduction of the atmospheric nitrogen fixing ability to plants. J. Biotechnol, nr. 1, p. 31-38.

Preininger, E., Gyurján, I., 2001 – Trials to create artificial nitrogen-fixing symbioses and associations using *in vitro* methods: an autlook. Vitro Cell Rev. Biol. –Plant, nr. 37, p. 139-148.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., 1996, Microbiology, Wm.C Brown Publishers, S.U.A.

Quak, F., 1977, Meristem culture and virus – free plants. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. (Ed.coord) Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., (Edt). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, p. 598-615.

Radoveț-Salinschi, D., 2004a, Studierea efectului apei „Pi" asupra vitroplantulelor hiperhidrice de *Coleus blumei Benth.*, Lucrările celui de al VI-lea Simpozion Internațional

Tinerii şi Cercetarea Multidisciplinară; România-Serbia & Muntenegru – Ungaria, 23-24 Septembrie 2004, Timişoara, p. 499-506

Radoveț-Salinschi, D., 2004b, Studierea capacității de aclimatizare a vitroplantulelor de *Coleus blumei Benth.* rezultate în subcultură din plantule hiperhidrice tratate cu apă sărăcită în deuteriu, Lucrările celui de al VI-lea Simpozion Internațional Tinerii şi Cercetarea Multidisciplinară; România – Serbia & Muntenegru – Ungaria, 23 – 24 Septembrie 2004, Timişoara, România, p.507-515.

Radoveț-Salinschi, D., 2007, Studii privind morfogeneza în vitrocultură a explantelor de *Coleus* de proveniență variată. Teză de doctorat, Univ. din Oradea (Cond. Șt. Cachiță, C.D.).

Radoveț-Salinschi, D, Cachiță, C.D., 2005a Influența apei sărăcite în deuteriu (87,5 ppm deuteriu) asupra vitroculturilor hiperhidrice de *Coleus hybridus Ethna* var. *Ethna.* In: Lucr. celui de al XIV-lea Simp. Naț. de Cult. de Țes. şi Cel. Veget., Sibiu 2005, intitulat: *Conservarea Vitroculturilor Vegetale*, (Ed.coord.). Cachiță, C.D, Sand, C., (Edt), Alma Mater, Sibiu, p. 158–173.

Radoveț-Salinschi, D., Cachiță. C.D., 2005b, Efectele apei sărăcite în deuteriu în recuperarea vitroculturilor de *Coleus* decompensate de hiperhidrie. Analele Științifice ale Universității de Stat din Moldova, Fascicolul „Științe chimico-biologice", Chişinău, p. 257-265

Radoveț-Salinschi, D., Cachiță, C.D., Blidar, C.F., Petruş-Vancea, A., 2005c, Capacitatea de aclimatizare a vitroplantulelor de *Coleus blumei Benth.* generate în subcultură de apexuri provenite de la plantule hiperhidrice tratate cu apă Pi. *Lucrările celui de al III-lea Congres „Apa – un miracol"*, vol.I, Constanța, iunie 2004, p. 60-61.

Rai, M.K., 2001, Current advances in mycorrhization in micropropagation. In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant, nr. 37 p. 158-167.

Ranga Rao, V., 1976, Nitrogenase activity in *Rhizobium* associated with leguminous and non-leguminous tissue cultures. Plant Sci. Lett. Nr. 6, p. 77-83.

Ranga Rao, V., Sopory, S., Subba Rao, N.S., 1974, Establishment of symbiosis *in vitro,* between *Rhizobium* and pea *(Pisum sativum)* root callus. Curr. Sci. nr. 43, p. 503-505.

Rayner M.C., 1927, „Mycorrhiza", New Phytol. reprint 15, Cambridge, Univ. Press, London and New York.

Reed, B.M., Mentzer, J., Tanprasert, P., Yu, Y., 1998, Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. Plant Cell Tiss. Org. Cult., nr. 52, p. 67-70.

Reddy, M.S., Satyanarayana, T., 1998, Ectomycorrhizal formation in micropropagated plantlests of *Populus deltoides.* Symbiosis, nr. 25, p. 343-348.

Regioso, M., Pedrol, N., (editori), 2002, *Allelopathy, from Molecules to Ecosystems.* Dep. de Biol. Vexelat e Ciencia de Solo, Univ. de Vigo, Spania.

Reigosa, M., Pedrol, N., 2002, Allelopathy From Molecules to Ecosystems, (Ed.-coord.) Reigosa, M., Pedrol, N., (Edt.) Science Publishers, USA:

Riffaud, J.L., Cornu, D., 1981, Utilisation de la culture in vitro pour la multiplication de merisiers adulters (*Prunus avium* L.), Selectionnes en foret. Agronomie, nr. 1, p. 633-640.

Robert, L.W., Miller, A.R., 1982, Ethylene and xylem differentiation, What's New in Physiol Plant nr. 13, p. 13-16.

BCU CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Roberts, E.H., King, M.W., 1982, Storage of recalcitrant seeds, In: Crop Genetic Resources – The Conservation of Difficult Material. (Ed.coord.) Withers L.A., Williams J.T. IUBS/ IBPGR/IGF, Paris, IUBS Series B42, p. 39-48.

Ross, M.K., Thorpe, T.A., Costerton, J.W. 1973, Ultrastructural aspects of shoot initiation in tobacco callus cultures. Am. J. Bot. vol. 8, nr. 60, p. 788-795.

Roux, N., 1987, Essais d'assainissement par thermothérapie et culture de méristéme de cerisiers et de pruniers virosés. Mémoire, ISI, Gembloux.

Rudawska, M., Kieliszewska-Rokicka, B., 1997, Miycorrhizal formation by *Paxillus involutus* in relation to their IAA-synthesizing activity. New Phytol. 137, p. 509-517.

Rugini, E., Verma, D.C., 1983, Micropropagation of difficult to propagate almond (*Prunus amydalus*) cultivar. Plant Sci Lett 28, p. 273-281.

Rugini, E., Tarini, P., Rossodivita, M.E., 1987, Control of shoot „vitrification" of almond and olive grown *in vitro*. Acta Hortic, nr. 212, p. 177-183.

Saher, S., Fernandez-Garcia, N., Piqueras, A., Hellin, E., Olmos, E., 2005 a, Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured *in vitro*: a hypoxia stress?. Plant Physiol Biochem, vol. 6, nr. 43, p. 168-179.

Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E., Olmos, E., 2004, Hyperhidricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. Physiol. Plant., nr. 120, p. 152-161.

Saher S., Piqueras A., Hellin E., Olmos E., 2005 b, Pectin methyl esterases and pectins in normal and hyperhydric shoots of carnation cultured *in vitro*. Plant Physiol Biochem, vol. 2, nr. 43, p. 155-159.

Sandu, C., 1998, Studiul randamentului micropropagării soiurilor de garoafe în Complexul de devirozare Codlea, Teză de doctorat, Univ. din Oradea, cond. șt. Cachiță, C.D., 251 p.

Sarkar, D., Pandey, S.K., Chanemougasoundharam, A., 2005, The role of calcium nutrition in potato (*Solanum tuberosum*) microplants in relation to minimal growth over prolonged storage *in vitro*. Plant Cell, Tiss. and Cult. nr. 81, p. 221-227.

Schell, J., 1974 – Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature, nr. 252, p. 169-170.

Schell, J., Van Montagu, M., De Beuckeller, M., De Block, M., Depicker, A., De Wilde, M., Engler, G., Genetello, C., Hernalsteens, J.P., Holsters, M., Seurinck, J., Silva, B., Van Vliet, F., Villarroel, R., 1979, Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefacians*, the Ti-plasmid and the plant host. Proc. R. Soc. Lond. B., nr. 204, p. 251-266.

Segretain, G., 1943, Culture d'un virus et son inoculation sur fragments de tiges de tabac cultivés *in vitro*. *Ann. Inst. Pasteur*, nr.69, p. 61-63.

Segretain, G., 1948, Virus et culture de tissus de Tabac et de Tomate. C.R. Ac. Sc., nr. 226, p. 594-595.

Segretain, G., Hirth, L., 1953, Action de substances azotées sur la multiplication du virus de la mosaique du tabac en culture de tissus. *C.R. Soc. Biol., Paris*, nr. 147, p.1042.

Shantharam, S., Matoo, A.K., 1997, Enhancing biological nitrogen fixation: an appraisal of current and alternative technologies for N input into plants. Plant Soil, nr. 194, p. 205-221.

Shetty, K., Carpenter, K.L., Curtis, O.F., Potter, T.L., 1996, Reduction of hyperhydricity in tissue cultures of oregano (*Origanum vulgare*) by extracellular polysaccharide isolated from *Pseudomonas* spp., Plant Science, vol. 2, nr. 120, p. 175-183.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Siddiqui, Z.A., Mahmood, I., 1998, Effect of a plant growth promoting bacterium, an AM fungus and soil types on the morphometrics and reproduction of *Meloidogyne javanica* on tomato. Appl. Soil Ecol., nr. 8, p. 77-84.

Skoog, F., 1944, Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *Amer. J. Bot.*, nr. 31, p. 19.

Smith, E.F., 1911, Crown-gall of plants. Phytopathol., nr. 1, p. 7-11.

Smith, E.F., Brown, N.A. McCulloch, L., 1912, The structure and development of crown gall. A plant cancer. *U.S. Dept. Agric., Bur. Plant Indus. Bull.* No. 255, 61 p.

Smith, E.F., Townsend, C.O., 1907, A plant tumor of bacterial origin. *Science*, nr. 25, p. 671-673.

Smith, T.A., 1985, Polyamines. Annu. Rev. Plant. Physiol. nr. 36, p. 117-143.

Somlyai, G., 2001, Să învingem cancerul! Efecte biologice ale reducerii de deuteriu - Râmnicu Vâlcea, Edt. Conphys, 325 p.

Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M., Zambryski, P., 1986, Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefacians*. Nature, nr. 318, p. 624-629.

Strange, R.N., 2003, *Introduction to Plant Pathology*, John Wiley&Sons, Ltd.

Stanley, 1935, (www.brainyencyclopedia.com/encyclopedia/t/to/tobacco_mosaic_virus.-html).

Strycharz, S., Shetty, K., 2002, Response of oregano (*Origanum vulgare* L.) clonal lines to *Pseudomonas* sp. Z strain and polydye R-478 and implications for hyperhydricity prevention in tissue culture. Process Biochemistry, vol. 3, nr. 38, p. 343-350.

Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Nowak, J., 1977, Biology and Fertility of Soil (din Agricell Rep., 1977 – iunie – p. 42.

Sutter, E.G., 1985, Morphological, physical and the chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*, Ann Bot nr. 55, p. 321-329.

Sutter, E., Hutzell, M., 1984, Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization of tissue-cultured plants to the greenhouse. Sci Hortic nr. 23, p. 303-312.

Sutter, E., Langhans, R.W., 1979, Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture, J Am Soc Hortic Sci nr. 104, p. 493-496.

Tacchini, P., Finck, A., Xing Xue, G., Gaspar, Th. Greppin, H., 1995, Plant Physiol. Biochem. 33, p. 361-366.

Taji, A.M., Doodd, W.A., Williams, R.R., 1992, *Plant Tisuue Culture Practice*. The Univ. of New England Publ. Unit, Armidale.

Taji, A.M., Williams, R.R., 1989, *In vitro* propagation of *Clianthus formosus* (Sturt's desert pea), an Australian native legume. Plant Cell Tiss. Organ Cult., nr. 16, p. 61-66.

Tanprasert, P., Reed, B.M., 1997, Determination of minimal bactericidal and effective antibiotic treatment concentrations for bacterial contaminants from micropropagated strawberries. In vitro Cell. Dev. Biol. Plant, 33, p. 227-230.

Tempe, J., Goldmann, 1982, Occurrence and biosynthesis of opines. In: *Molecular Biology of Plant Tumors*, (Ed.coord.) Kahl, G., Schell, J. (Edt.). Academic Press, New York, p. 427-449.

Teng, W.L., Liu, Y.J., 2005, Restricting hyperhydricity of letuce using screen raft and water absorbent resin. Plant Cell Tiss. Organ Cult., vol. 3, nr. 34, p. 311-314.

Tepfer, D., Tempé, J., 1981, Production d'agropine par des racines formées sous l'action d'*Agrobacterium tumefaciens*, souche A4. C. R. Acad. Sci., Paris, nr. 292, p. 153-156.

Thomas, P., 2004, A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. Current Science, vol. 87, nr. 1, p. 67-72.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Thomas, P., 2004, In vitro decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of long-term micropropagated triploid watermelon cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult., vol. 77, p. 173-179.

Thomas, P., Prakash, G.S., 2004, Sanitizing long-term micropropagated *in vitro* grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants for fortility after eight years *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*., vol. 40, nr.6, p. 603-607.

Thomas, P., Mythil, J.B., Shivashankara, K.S., 2000, Explant, medium and vessel aeration affect the incidence of hyperhydricity and recover of normal plantlets in triploid watermelon. J. of Horticultural Science and Biotechnology, vol. 75, nr. 1, p. 19-25.

Torrey, J.G., 1986, Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. In: *New Root Formation in Plants and Cuttings*. (Ed.coord.) Jackson, M.B., (Edt.), Martinus Nijhoff Publishers, p. 31-66.

Toussaint, A., 1985, Contribution à la caractérisation des viroses de *Cymbidium* cvs cultivés en Belgique et possibilité de leur éradication par la culture *in vitro*. Thèse Fac. Sci. Agron., Gembloux (Belgique), 388 p.

Toussaint, A., Kummert, J., Maroquin, C., Lebrun, A., Roggemans, J., 1993, Use of Virazole® to eradicate *Odontoglossum* ringspot virus from *in vitro* cultures of *Cymbidium* SW. Plant Cell Tiss. Organ. Cult., nr 32, p. 303-309.

Trouvelot, A., Kough, J.L., Gianinazzi-Pearson, V., 1986, Mesure du taux de mycorrhization VA d'un systeme radiculaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and General Aspects of Mycorrhizae*. (Ed.coord.) Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., (Edt). Paris: INRA, p. 217-221.

Turnbull, C.G.N., Booker, J.P., Ottoline, Leyser, H.M., 2002, Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. Plant J., nr. 32, p. 255-262.

Tzfira, T., Yarnitzky, O., Vainstein, A., Altman, A., 1996, *Agrobacterium rhizogenes*-mediated DNA transfer in *Pinus halepensis* Mill. Plant Cell Reports, nr. 16, p. 26-31.

Tzitzikas, E.N., Bergervoet, M., Raemarkers, K., Vincken, J.P., Van lammeren, A., Visser, R.G., 2004, Regeneration o Pea (*Pisum sativum* L) by a cyclic organogenic system. In: Plant Cell Rep., vol. 14. nr. 22, p. 782-796.

Ueno, K.I., Shetty, K., 1996, Effect of selected polysaccharide-producing soil bacteria on hyperhydricity in *Oregano* tissue cultures. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, nr. 2, p. 767-770.

Ueno, K.I., Cheplick, S., Shetty, K., 1998, Reduced hyperhydricity and enhanced growth of tissue culture-generated raspberry (*Rubus* sp.) clonal lines by *Pseudomonas* sp. isolated from oregano, Process Biochemistry, vol. 4, nr. 33, p. 441-445.

Váczy, C., 1980, *Dicționar botanic poliglot*, Ed. Științifică și Enciclopedică, București.

Valera-Montero, L., Ochoa-Alejo, N., 1992, A novel approach for chili peeper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration shoot induction on rooted hypocotyls. *Plant Science*, nr. 84, p. 215-219.

Valladares, S., Toribio, M., Celestino, C., Vieitez, A.M., 2004, Cryopreservation of embryogenic cultures from mature *Quercus suber* trees using vitrification. Cryo Letters, vol. 3, nr.25, p. 177-186.

Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J., 1974, Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. Nature, nr. 252, p. 169-170.

Vandemoortele, J.L., Billard, J.P., Boucaud, J., Gaspar, T., 1999, Evidence for an interaction between basal medium and plant growth regulators during adventitious or axillarry shoot formation of cauli-flower., In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant 35, p.13-17.

Varga, Sz.S., Korányi, P., Preininger, É.,Gyurján, I., 1994, Artifical associations between *Daucus* and nitrogen-fixing *Azotobacter* cells *in vitro*. Physiol. Plant. 90, p. 786-790.

Vaşil, V., Vasil, I.K., Zuberer, D.A., Hubbel, D.H., 1979, The biology of *Azospirillum-sugarcane* association. I. Establishment of the association. Z. Pflanzenphysiol, nr. 95, p. 141-147.

Vestberg M., Estaun V., 1994, Micropropagated plants, an opportunity to positively manage mycorrhizal activities. In: *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*, (Ed.coord.) Gianinazzi, S., Schuepp, H. (Edt.), Birkhauser, Basel, p. 217-226.

Vestberg M., Uosukainen, M., 1996, Effect of AMF inoculation on rooting and subsequent growth of cuttings and microcuttings of greenhouse rose Mercedes. In: *Novel biotechnological approaches to plant production: from sterile root to mycorrhizosphere*. Pisa, Italy, p. 46.

Vieitez, A.M., Ballester, A., San-Jose, M.C., Vieitez, E., 1985, Anatomical and chemical studies of vitrified shoot of chestnut regenerated *in vitro*. Physiol Plant nr. 65, p. 177-184.

Vieitez, A.M., Ballester, A., San-Jose, M.C., Vieitez, E., 1987, Vitrification in chestnut shoot regenerated *in vitro*. Acta Hortic., nr. 212, p. 231-234.

Vieth, J., Morisset, C., Lamond, M., 1983, Histologie de plantules vitreuses de *Pyrus malus* cv. M 26 et de Pelargonium peltatum cv. Chester Frank, issues de la culture *in vitro* (Etude preliminaire). Rev Can Biol Exp nr. 42, p. 29-32.

Viss, P.R., Brooks, E.M., Driver, J.A., 1991, A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 27P, p.42.

Volcani, Z., Riker, A.J., Hildebrandt, A.C., 1953, Destruction of various tissues in culture by certain bacteria. *Phytopathol., 43*, p. 92-94.

Von, Alten, 1998, State of commercial use of AMF-inoculum in Germany. In: *Arbuscular Mycorrhizas in Sustainable Soil-Plant Systems*. Report of 1997 activities, (Ed.coord.) Gianinazzi, S.; Schuepp, H., Iceland.

Von Arnold S., Ericksson T., 1984, Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* L., Plant Cell Tiss. Organ Cult. nr. 3, p. 257-264.

Wang, T., Nie, Y.F., Li, S.C., 1994, Nitrogen fixation in para-nodules on *Triticum aestivum* seedlings induced by 2,4-D and inoculation with different diazotrophs. In: *Symp. on nitrogen fixation with non leguminous crops*. (Ed.coord.) Nie, Y.F., Kennedy, I.R., Chen, T.W., (Edt.). Int. Quingdao Ocean University Press, p. 103-109.

Wang, P.J., Hu, C.Y., 1980, Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. In: *Advanes in biochemical engineering, 18. Plant Cell Cultures II*. Springer-Verlag, Berlin, p. 61-99.

Wang, P.J., Hu, C.Y., 1982, *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato productiom in Taiwan. Am. Potato J., nr. 59, p. 33-37.

Wardle, K., Dobbs, E.B., Short, K.C., 1983, In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity, J Am Soc Hortic Sci, nr. 108, p. 386-389.

Webster, G., Gough, C., Vasse, .I., Batchelor, C.A., O'Callaghan, K.J., Kothari, S.L., Davey, M.R., Dénarié, J., Cocking, E.C., 1997, Interactions of rhizobia and wheat. Plant Soil 194, p.115-122.

Wenkart, S., Roth-Bejerano, N., Mills, D., Kagan-Zur, V., 2001, Mycorrhizal associations between Tuber melanosporum mycelia and transformed roots of Citus incanus. Plant cell reports, vol. 20, nr. 4, p. 369-373.

Werker, E., Leshem, B., 1987, Structural changes during vitrification of carnation plantlets. Ann Bot, nr. 59, p. 377-385.

Werner, E.M., Boe, A.A., 1980, *In vitro* propagation of Malling-7apple rootstocks. HortScience, nr. 15, p. 509-510.

Whitaker, T., 1934, The occurence of tumors on certain *Nicotiana* hybrids. *Jour. Arnold Arborelum*, 15, p. 144-155.

White, P.R., 1934, Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. Phytopathology, nr. 24. p. 1003-1011.

White, P.R., 1937, Vitamin B_1 in the nutrition of excised tomato roots. Pl. Physiol., Lancaster 12, p. 803-811.

White, P.R., 1939a, Potentially unlimited growth of excised plant callus in an arificial nutrient. *Amer. J. Bot.* 26, p. 59.

White, P.R., 1939b, Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bull. Torrey bot. Club.* 66, p. 507.

White, P.R., 1941, Plant tissue cultures. Biol. Rev., nr. 16, p.34-38.

White, P.R., 1943, *A Handbook of Plant Tissue Culture*. J. Cattell, Lancaster.

White, P.R., 1944,. Transplantation of plant tumors of genetic origin. *Cancer Res.* 4, p. 791-794.

White, P.R., 1951, Neoplastic growth in plants. The Quaterly Review of Biology T, 26, p. 1-16.

White, P.R., 1963, *The cultivation of animal and plant cells*. Roland Press, New-York.

White, Ph.R., Braun, A.C., 1942, A cancerous neoplasm of plants Autonomous bacteria – free crown-gall tissue. Cancer Res., 2, p. 597-617.

Winston, G.W., 1990, Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*, (Ed.coord.) Alscher, R.G, and Cumming, J.R. (Edt), Wiley-Liss Inc, p. 57-86.

Wilkins, C.P., Dodds, J.H., 1983, Tissue culture propagation of temperate fruit trees. In: *Tissue culture of tres*. (Ed.coord.) Dodds J.H., (Edt.) Croom Helm, London, p. 56-79.

Witers, L.A., Alderson, P.G., 1986, *Plant tissue culture and its agricultural aplication*. Butterworth, London

Williams, R.R., Taji, A.M., 1991, Effect of temperature, *gel* concentration and cytokinins on *Olearia microdisca* (J.M. Black) *in vitro* shoot cultures. Plant Cell Tiss. Organ Cult., nr. 26, p. 1-6.

Wu, J.H., Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., 1960, Virus-host relationship in plant tissu culture. Phytopathology, nr. 50, p. 587.

Yadav, M.K., Gaur, A.K., Garg, G.K., 2003, Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. Plant Cell Tiss. Oragan Cult.vol. 2, nr. 72, p. 153-156.

Yadav, M.K., Gaur, A.K., Garg, G.K., 2008, Development of suitable protocol overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. Plant Cell, Tiss. Organ Culture, nr. 72, p. 153-156.

BABEȘ-BOLYAI UNIVERSITY LIBRARY

Yao, M.K., Tweddell, R.J., Desilets, H., 2002, Effect of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of micropropagated potato plantlets and on the extent of disease caused by Rhizoctonia solani. Mycorrhiza, vol. 12, nr. 5, p. 235-242.

Zaenen, I., VanLarebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M., Schell, J., 1974, Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium strans*. J. Mol. Biol., 86, p. 109-127.

Zamfirache, M.M., Toma, C., 2000, *Simbioza în lumea vie*, Ed. Universității „Alex. I. Cuza" Iași.

Zarnea, G., 1983, 1984, *Tratat de microbiologie generală*, vol. I-II, Ed. Academia R.S.România, București.

Zhu, Y., Takemoto, T., Yazawa, S., 1993, Leaf color of plants regenerated of caladium. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci., nr. 62, p. 619-624.

Zhu, Y.X., Ou-Yang, W.J., Zhang, Y.F., Chen, Z.L., 1996, Transgenic sweet pepper plants from Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, nr. 16, p. 71-75.

Zielinski, M.H., 1955, Wptyw mikroorganizmów na wzrost I produkcje chlorofilu tkanki Daucus carola hodowanej in vitro. Spraw. Pozn. Tow. Przyj. Nauk., nr. 2, p. 333-336.

Zimmerman, R.H., 1984, Apple. In: Handbook of plant cell culture. Vol. 2, Crop species. (Ed.coord.) Evans, D.A., Ammirato, P.V., Yamada, Y., (Edt.) Macmillan, New York, p. 369-395.

Zimmerman, T.W., Cobb, B.C., 1989, Vitrification and soluble carbohydrates levels in *Petunia* leaves as influenced by media gelrite and sucrose concentrations. Plant Cell Rep., nr. 8, p. 358-360.

Zimmerman, R.H., Swartz, H.J., 1994, *In vitro* culture of temperate fruits. In: *Plant Cell Tissues Culture*. (Ed.coord.) Vasil, I.K., Thorpe, T.A. (Edt. Dordrecht, Olanda: Kluver, p. 457-474.

Zimmerman, R.H., Zae, B.W., Fordham, L., 1987, Comparison of rooting methods for apple cultivars *in vitro*. Acta Horticulturae, 212, p. 303-310.

Zimmerman, T.W, Rogers, S.M.D, Cobb, B.G., 1991, Controlling vitrification of petunia *in vitro*. In Vitro Cell Dev. Biol Plant, nr. 27, p. 165-167.

Zimmerman, T.W., Scorza, R., 1996, *Mol. Breed.*, nr. 2, p. 73-80.

Zimmerman, R.H., Griesbach, R.J., Hammerschlag, F.A., Lawson, R.H., 1986, *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops.*, Conference on Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops, (Edt.) Bietsville, Martinus Nijhoff Publ., p. 25-36.

Zinsmeister, A., 1991, The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*, Plant Cell Tiss. Organ Cult., Plant Cell Reports - Biomedical and Life Sciences, vol. 38, nr. 2-3, p. 171-179.

Ziv, M., 1986, In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plant. In: *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*, (Ed.coord.) Withers, L., Alderson, P. (Edt.), Buttervorth, London, p. 187-196.

Ziv, M., 1991, Vitrification: morphological and physiological desorder of "in vitro" plants. In: *Micropropagation. Technology and Applications*. (Ed.coord.) Debergh, P.C., Zimmerman, R.H., (Edt.), Kluwer, Academic Publishers, Olanda, p. 45-69.

Ziv, M., Ariel, T., 1992, On the relation between vitrification and somatal cell wall deformity in carnation. Acta HortS., nr. 314, p. 121-129.

Ziv, M., Meir, G., Halevy, A.H., 1983, Factors influencing the production of hardened glaucus carnation plantlets in vitro. Plant Cell Tiss. Organ Cult., nr. 2, p. 55-65.

Ziv, M., Schwartz, A., Fleminger, D., 1987, Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllud)* plants propagated *in vitro*; implication for hardening. Plant Sci, nr. 52, p. 127-134.

Zobayed, S.M.A., Armstrong, J., Armstrong, W., 2001 a, Leaf anatomy of in vitro tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. Plant Science, vol. 3, nr. 161, p. 537-548.

Zobayed, S.M.A., Armstrong J., Armstrong W., 2001 b, Micropropagation of Potato: Evaluation of Closed, Diffusive and Forced Ventilation on Growth and Tuberization. Annals of Botany, vol. 1, nr. 87, p. 53-59.

Zucherelli, G., 1979, Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti clonal del pesco. Frutticoltura, nr. 2, p. 15-20.

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE
Cota veche | Prețul
37,5 lei

BIBL. CENTR. UNIV.
M. „EMINESCU" IAȘI
BIOLOGIE

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Studiile referitoare la culturile de țesuturi și celule vegetale, inițiate la începutul secolului XX, au avut o perioadă de "creștere și de înflorire", pe parcursul a mai mult de 100 de ani, succesele obținute fructificându-se prin apariția - pe plan mondial - a numeroase lucrări științifice și tratate de specialitate, dar și a unor activități practice care au valorificat totipotența celulelor plantelor, exploatând această valență în scopuri variate, cum sunt: tehnicile de micropropagare, obținerea de plante libere de boli (în special de viroze), producerea de compuși secundari de metabolism, fabricarea de semințe artificiale (și altele), ramuri industriale ce poartă numele de *biotehnologii vegetale*, care au produs mutații ocupaționale, ce au marcat economia mondială prin ceea ce se numește "revoluția verde".

Volumul II al prezentului "*Tratat de biotehnologie vegetală*" dezbate, în principal, aspecte referitoare la implicarea tehnicilor de vitrocultură în studierea interrelaționării celulelor plantelor cu germenii fitopatogeni, dar și în ceea ce privește neoplazmul la cormofite, precum și vitrogrefele la nivelul fitoinoculilor.

www.edituradacia.ro
ISBN 978-973-35-2466-3